

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E

HEPATOLOGIA

**EXPRESSÃO DE MIR-122, MIR-155 E MIR-217 EM UM MODELO DE EXPOSIÇÃO  
CRÔNICA AO ETANOL EM ZEBRAFISH ADULTO**

AMANDA PASQUALOTTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E  
HEPATOLOGIA

**EXPRESSÃO DE MIR-122, MIR-155 E MIR-217 EM UM MODELO DE EXPOSIÇÃO  
CRÔNICA AO ETANOL EM ZEBRAFISH ADULTO**

AMANDA PASQUALOTTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção de título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Uribe-Cruz

Porto Alegre

2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Pasqualotto, Amanda

Expressão de miR-122, miR-155 e miR-217 em um modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto / Amanda Pasqualotto. -- 2019.

76 f.

Orientadora: Carolina Uribe Cruz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Doença hepática alcoólica. 2. microRNAs. 3. Zebrafish. I. Uribe Cruz, Carolina, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por esses 2 anos de mestrado, pelos desafios enfrentados e suporte dEle até agora.

Aos meus pais, Luíz e Rosecler e ao meu irmão Nicolás, pela motivação e suporte nestes dois anos. Obrigada por tudo, vocês foram essenciais.

Á minha orientadora Profa. Dra. Carolina Uribe-Cruz, por todo empenho, confiança, paciência e dedicação. Por todos os ensinamentos desde a iniciação científica e a finalização do mestrado. Sou grata por me mostrar como é maravilhosa a pesquisa e por todo o meu amadurecimento profissional e científico.

Á Raquel Ayres, amiga e colega de profissão que auxiliou nas etapas de experimento e análises. Obrigada pelos momentos de descontração e pela motivação quando estava exausta e desanimada.

Á Larisse Longo, por todo apoio, ajuda e conselhos na escrita, técnicas e pela linda amizade que construímos ao longo desses anos. Muito obrigada amiga.

Á Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira pela oportunidade de ter ingressado no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia. Obrigada por todos os ensinamentos e por ser incentivadora deste estudo.

Aos colegas do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia: Ariane Tainá, Gabriel Guerreiro, Michele Serafini, Rutiane Thoen, Carolina Beskow, Juliana Bruch, Valessa Gabriel, Dienifer Sirena e Raíssa Nardi pelos momentos de discussão científica, de conversas, descontração, ajuda nos experimentos, cafés, lanches e risadas. Agradeço em especial as amigas Jéssica Ferrari e a Ana Carolina

Henzel Raymundo por todas as conversas, conselhos, risadas e choros ao longo destes anos. Vocês foram essenciais nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira e a toda equipe do Laboratório do Departamento de Bioquímica da UFRGS pelo espaço cedido e por todo o auxílio na logística do experimento.

Ao Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, em especial ao secretário Everaldo Almeida por toda incansável ajuda.

Ao grupo de amigos denominado C.S.I: Ana Carolina Henzel Raymundo, Viviane Gabriel, Natali Cardoso e Vinicius Evaldt vocês me fizeram sorrir nos momentos mais difíceis. Obrigada por serem tão especiais comigo.

A todos os meus amigos, por todos os momentos que juntos compartilhamos. Por todo o amor que sempre me trataram, por toda a compreensão que tiveram quando precisei me ausentar nos momentos que os deveres do mestrado me chamavam. Sem vocês, com certeza, tudo seria mais difícil.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Pró-Reitoria de Pesquisa – UFRGS e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo aporte financeiro para que esse estudo fosse concluído.

## RESUMO

**Introdução e Objetivo:** O consumo excessivo de álcool continua como uma das principais causas de doença hepática em todo o mundo. Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes que atuam no nível pós-transcricional para regular a expressão de seus respectivos RNAs mensageiros. Na atualidade, estão sendo utilizados para diagnóstico e prognóstico, bem como para futuras terapias gênicas de diversas doenças, inclusive doenças hepáticas. Entre os modelos para os estudos de doenças hepáticas, o zebrafish vem se destacando por possuir muitas vantagens. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão hepática e sérica de miR-122, miR-155 e miR-217 em um modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto. **Métodos:** Zebrafish adultos de ambos os sexos, foram divididos em dois grupos (n=281): Grupo Etanol (GE) exposto a 0,5% v/v na água do aquário e Grupo controle (GC), sem exposição ao etanol. Após 28 dias os animais foram eutanasiados. No tecido hepático foram realizadas análises histopatológicas, quantificação de lipídios e triglicerídeos e a avaliação das citocinas inflamatórias *il-1 $\beta$* , *il-10* e *tnf- $\alpha$* . A expressão de miR-122, miR-155 e miR-217 foi quantificada no tecido hepático e no soro. **Resultados:** Após os 28 dias de exposição ao etanol, as análises histopatológicas mostraram lesão hepática e deslocamento dos núcleos dos hepatócitos no grupo GE, confirmada pela quantificação de acúmulos de lipídios. A expressão gênica de *il-1 $\beta$*  mostrou aumento no GE, entretanto *il-10* e *tnf- $\alpha$*  não apresentaram diferenças entre os grupos. A análise da expressão hepática de miR-122 e miR-155 foram aumentadas no GE, porém miR-217 hepático não apresentou diferença entre os grupos. A análise de expressão circulante de miR-155 e miR-217 apresentou aumento significativo no GE, porém miR-122 circulante não apresentou diferença entre os grupos. **Conclusão:** A exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto promove dano hepático, acúmulo de lipídios nos

hepatócitos e variação nas citocinas inflamatórias do fígado. A expressão dos microRNAs circulantes e hepáticos é aumentada pela indução com etanol. Estes achados sugerem que os microRNAs juntamente com este modelo é adequado para estudos de mecanismos, fisiopatogenia e até terapêutica da DHA.

**Palavras chave:** Doença hepática alcoólica, MicroRNAs, Zebrafish

## ABSTRACT

**Introduction and Aim:** Excessive alcohol consumption continues as one of the main causes of liver disease worldwide. MicroRNAs are small non-coding RNAs that act at the post-transcriptional level to regulate the expression of their respective messenger RNAs. Currently, they are used for diagnosis and prognosis, as well as future gene therapies of various diseases, including liver diseases. Among the models for liver disease studies, zebrafish has been shown to have many advantages. The aim of this study was to evaluate the hepatic and serum expression of miR-122, miR-155 and miR-217 in a model of chronic exposure to ethanol in adult zebrafish. **Methods:** Adults zebrafish wild type of both sexes were divided into two groups (n = 281): Ethanol Group (EG), exposed to 0.5% v/v in the aquarium water and Control Group (CG), without exposure to ethanol. After 28 days the animals were euthanized. Histopathological analysis, quantification of lipids and triglycerides and evaluation of inflammatory cytokines *il-1 $\beta$* , *il-10* e *tnf- $\alpha$*  were performed in liver tissue. Expression of miR-122, miR-155 and miR-217 was quantified in liver tissue and serum. **Results:** After 28 days of exposure to ethanol, histopathological analysis showed hepatic lesion and displacement of hepatocyte nuclei in the EG, confirmed by the quantification of lipid accumulations. The gene expression of *il-1 $\beta$*  showed increase in EG, but *il-10* and *tnf- $\alpha$*  showed no differences between groups. Analysis of hepatic expression of miR-122 and miR-155 was increased in EG, but hepatic miR-217 showed no difference between groups. The analysis of circulating expression of miR-155 and miR-217 presented a significant increase in the EG, but miR-122 circulating did not present difference between the groups. **Conclusion:** Chronic ethanol exposure in adult zebrafish produces hepatic damage, lipids accumulation in hepatocytes and variation in the inflammatory cytokines of the liver. The expression of circulating and hepatic



microRNAs is altered by induction with ethanol. These results indicate that miRNA, as well as the adult model of zebrafish, are potential tools for the study of mechanisms, pathophysiology and even ALD therapy.and possible therapeutic targets.

**Keywords:** Alcoholic liver disease, microRNAs, zebrafish.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espectro da doença hepática alcoólica.....	15
<b>Figura 2:</b> Representações simplificadas dos sistemas de oxidação do etanol .....	17
<b>Figura 3.</b> Sinalização de TLR4 na DHA.....	18
<b>Figura 4:</b> Via metabólica dos microRNAs.....	21
<b>Figura 5:</b> Papel dos microRNAs na DHA.....	23
<b>Figura 6:</b> Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) .....	29
<b>Figura 7:</b> Comparação da anatomia do fígado do zebrafish e do ser humano .....	29

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Estudos da expressão de miR-122, miR-155 e miR-217 na DHA.....	60
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

CHC	Carcinoma hepatocelular
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DHA	Doença hepática alcoólica
GGT	Gama glutamil transferase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MEOS	<i>microsomal ethanol oxidizing system</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPAR-α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor- alpha</i>
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor- gamma</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SIRT1	Sirtuína 1
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor- alpha</i>
TLR4	Receptor <i>Toll-like-4</i>
UTR	<i>untranslated region</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1 Doença Hepática Alcoólica .....	15
2.1.1 Características gerais .....	15
2.1.2 Mecanismos de Ação do Álcool.....	16
2.2 MicroRNAs e DHA.....	20
2.2.1 Biogênese e Função dos MicroRNAs .....	20
2.2.2 miR-122, miR-217 e o miR-155 na DHA.....	22
2.3 Modelos Experimentais de DHA .....	26
2.3.1 Zebrafish e Modelos de DHA.....	28
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>QUESTÃO DE PESQUISA .....</b>	<b>34</b>
<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>36</b>
Objetivos Secundários .....	36
<b>ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS .....</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>59</b>
<b>PERPECTIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença Hepática Alcoólica (DHA) é uma patologia de preocupação para a população e o Estado. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2018, estima-se que 3% de todas as mortes globais estão relacionadas com o álcool. O Relatório Global sobre Álcool e Saúde de 2018 publicado pela OMS, ressalta que indivíduos com idade a partir de 15 anos consumiram em torno 6,4 litros de álcool puro, equivalente a 13,9 gramas por dia. No Brasil o número é ainda maior, em 2016 o consumo estimado foi equivalente a 7,8 litros de álcool puro *per capita*. No mesmo ano foram registradas 3 milhões de mortes em todo o mundo relacionadas ao consumo de álcool<sup>1</sup>. A DHA acarreta em prejuízos econômicos, pois potencializam os custos de hospitais e outros dispositivos do sistema de saúde, judiciário, previdenciário, e a produtividade no trabalho. Seu tratamento ainda é escasso sendo o tratamento mais eficaz a abstinência de álcool<sup>2</sup>.

A DHA se caracteriza por um espectro de lesões hepáticas que variam de esteatose caracterizada pela presença de lipídios em pelos menos 5% dos hepatócitos, podendo acarretar em esteato-hepatite, fibrose, cirrose e até carcinoma hepatocelular (CHC) em alguns casos. <sup>3; 4; 5; 6</sup>. Na DHA está envolvido os efeitos do álcool e os metabólitos tóxicos em vários tipos celulares hepáticos, o que regula positivamente a cascata inflamatória<sup>7</sup>.

Atualmente vem se estudando a possibilidade de utilizar novas ferramentas de diagnósticos e alvos terapêuticos, entre elas os microRNAs. Os microRNAs são pequenos RNAs de 18-24 nucleotídeos não codificantes, estes estão envolvidos em vários processos celulares e possuem a característica de migrar pela corrente sanguínea protegidos por vesículas que evitam sua degradação<sup>8; 9; 10 11</sup>. Isto faz deles

uma potencial ferramenta para diagnóstico, estudos de novos mecanismos e no uso da terapêutica <sup>7</sup>.

Os microRNAs são abundantes no fígado e modulam um espectro de processos celulares associados à lesão hepática, como inflamação, apoptose e regeneração dos hepatócitos. Alguns microRNAs já foram encontrados e apresentaram sua expressão alteradas com a exposição ao etanol<sup>7</sup>. O miR-122, miR-155 e o miR-217 são alguns candidatos a serem estudados na DHA, pois ambos têm suas expressões modificadas frente a este tipo de dano hepático <sup>8; 12; 13; 14; 15</sup>.

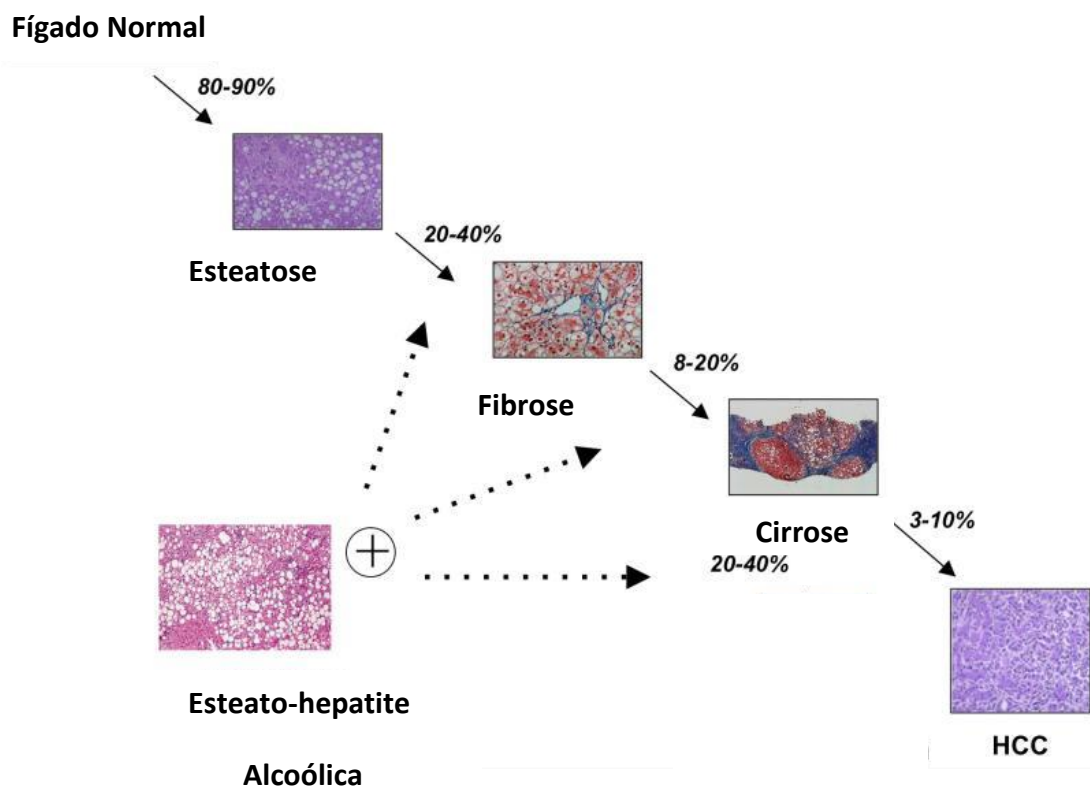
Para o estudo de doenças hepáticas o zebrafish como modelo animal vem se destacando. É um peixe de água doce que apresenta inúmeras vantagens como sua homologia anatômica, fisiológica e molecular com os mamíferos<sup>16</sup>. Os genes do zebrafish são altamente conservados em relação aos humanos, tornando-o um interessante modelo para estudar os mecanismos básicos para o estudo da doença hepática como a DHA. O zebrafish possui as vias de metabolização do álcool e a sua exposição ao etanol é facilitada, precisando só adicionar o etanol na água dos aquários<sup>17; 18</sup>.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doença Hepática Alcoólica

#### 2.1.1 Características gerais

A Doença Hepática Alcoólica refere-se a danos no fígado causados pelo consumo excessivo de álcool. É uma das principais causas de cirrose, CHC, insuficiência hepática aguda e crônica, e por sua vez, causa morbidade e mortalidade significativas em todo mundo<sup>19</sup>. Ela é caracterizada por um espectro de lesões que variam de esteatose simples e esteato-hepatite, podendo gerar lesões mais graves como fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular<sup>20</sup> (Figura 1).



**Figura 1:** Espectro da doença hepática alcoólica. O consumo excessivo de etanol gera um amplo espectro de lesões hepáticas. A esteatose é a lesão mais com comum, cerca de 90% das pessoas que bebem em excesso, cerca de 4 a 5 doses por dia. Continuando com este



consumo pode acarretar em lesões mais graves como a esteato-hepatite (inflamação do fígado), fibrose, cirrose e até carcinoma hepatocelular. Fonte: Farooq & Bataller<sup>21</sup>.

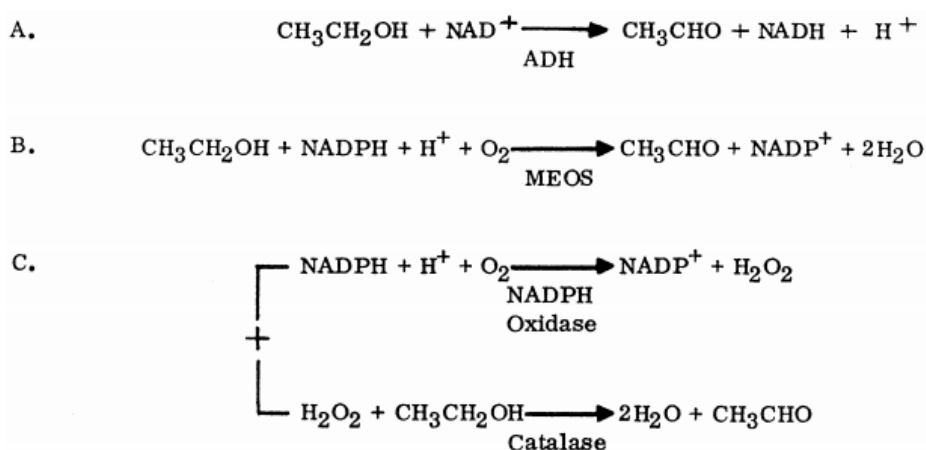
A primeira lesão a ser considerada é a esteatose hepática (acúmulo de lipídios nos hepatócitos) que pode se desenvolver em 90-95% dos homens que consomem doses de etanol superiores a 40 g/dia e mulheres que ingerem 20g/dia ou mais, contudo pode ocorrer em indivíduos com um consumo menor <sup>22; 23</sup>. A esteatose hepática é geralmente assintomática e pode ser completamente reversível com abstinência do álcool por 4 a 6 semanas. No entanto, cerca de 5% a 15% do pacientes podem progredir para fibrose e cirrose <sup>24</sup>.

O consumo excessivo de álcool é considerado o maior fator de risco para doenças crônicas e foi responsável por 3% de todas as mortes em 2016<sup>1</sup>. O consumo de álcool está diretamente associado à morte por doença hepática, e impactando assim, grandes custos sociais e econômicos<sup>5</sup>. Segundo o relatório global sobre álcool e saúde de 2018-OMS, no Brasil cerca de 40% da população consumiu álcool nos últimos 12 meses. No ano de 2016, o consumo estimado em nosso país foi de 7,8 litros de álcool puro *per capita*, sendo que a média de consumo mundial é de 6,4 litros, mostrando assim que o perfil do brasileiro está acima da média<sup>1</sup>.

### 2.1.2 Mecanismos de Ação do Álcool

O fígado é o principal órgão de metabolização do álcool no organismo, sendo este processo realizado em três etapas distintas. A primeira etapa é pela enzima álcool desidrogenase, enzima responsável por converter álcool em acetaldeído, que rapidamente é convertido em acetato pela enzima aldeído desidrogenase e eventualmente é metabolizado em dióxido de carbono e água <sup>25</sup>. A segunda etapa envolve o sistema de MEOS (do inglês *Microsomal Ethanol Oxidizing System*) e o

citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que compreendem uma forma alternativa de metabolização do álcool. A terceira é a via é da catalase que está localizada nos peroxissomas dos hepatócitos<sup>5; 26</sup> (Figura 2). O metabolismo do álcool acarreta na geração de um metabólito tóxico, o acetaldeído, que reage com algumas proteínas para formar adutos de acetaldeído resultando assim, em funções proteicas inadequadas. Seu metabolismo também induz o aumento da produção de ROS (do inglês *Reactive Oxygen Species*) através do CYP2E1<sup>27</sup>.

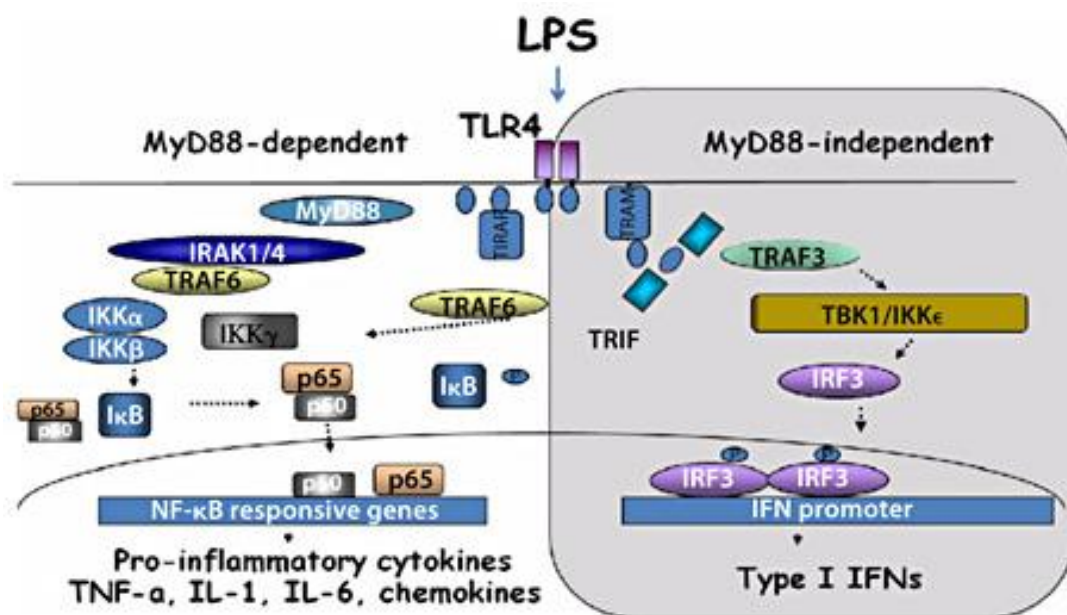


**Figura 2:** Representações simplificadas dos sistemas de oxidação do etanol. A) Oxidação pela álcool desidrogenase, a primeira etapa ocorre no citosol e a segunda na mitocôndria, envolvendo a aldeído desidrogenase; B) A via das enzimas microsossomais oxidativas que envolve a atividade do citocromo P450 2E1; C) Via da catalase. Fonte: Lieber et al,<sup>28</sup>. ADH: álcool desidrogenase; MEOS: *microsomal ethanol oxidizing system*

O consumo crônico de bebidas alcoólicas pode aumentar a permeabilidade da membrana intestinal, levando ao aumento de endotoxinas derivadas do intestino para o sangue e fígado. Um dos principais produtos bacterianos translocados desde o intestino são os lipopolissacarídeos (LPS) que ativam o receptor *Toll-like-4* (TLR4), expressos em macrófagos recrutados, hepatócitos, células endoteliais sinusoidais e

células estreladas e acabam levando a ativação das células de Kupffer <sup>29; 30</sup>. Estas podem liberar uma grande quantidade de ROS e citocinas inflamatórias, iniciando assim a cascata inflamatória<sup>25</sup> (Figura 3). Foi demonstrado que a resposta imunitária inata referente ao etanol desempenha papel predominante na patogênese da DHA. <sup>31; 32</sup>.

Entretanto, a imunidade inata compreende barreiras físico-químicas, bem como defesa celular contra qualquer invasor ou agente imunológico que o sistema reconhece como perigoso. As células de defesa que incluem as células imunes e em conjunto com algumas proteínas (citocinas), normalmente estão bem equilibradas para responder a qualquer perigo, evitando ativação imune desnecessária. O álcool acaba gerando conflito no equilíbrio entre células de defesa e proteínas, gerando uma resposta imune que resulta em inflamação<sup>31; 33</sup>.



**Figura 3.** Sinalização de TLR4 na DHA. O LPS é detectado pelo TLR4, que induz as vias de sinalização MyD88 –dependente e MyD88 independente, assim desencadeando a cascata inflamatória. Fonte: Szabo et al.,<sup>34</sup>. TLR4: Toll-like receptor 4; DHA: Doença Hepática Alcoólica; LPS: Lipoolissacarídeo; MyD88: *Myeloid differentiation primary response 88*.

Dentro das citocinas pró-inflamatórias encontramos a IL-1 $\beta$  (do inglês *Interleukin*) de grande importância na DHA<sup>35</sup>. Tanto em modelos animais, como em pacientes com DHA tem se relatado que os níveis circulantes e hepáticos de pró-IL  $\beta$  estão aumentados<sup>36; 37</sup>. A IL-1 $\beta$  é produzida como pró-IL- $\beta$  inativa em resposta a estímulos inflamatórios, que incluem tanto produtos microbianos, quanto moléculas endógenas tóxicas<sup>25</sup>.

O TNF- $\alpha$  (do inglês *Tumor Necrosis Factor- alpha*) está envolvido em processos da inflamação sistêmica e tem importante papel na mediação de processos fisiológicos, como inflamação, proliferação celular e apoptose<sup>38</sup>. No fígado, este é produzido principalmente pelas células de Kupffer e tem papel crítico na progressão da DHA, porém seu mecanismo de ação frente ao álcool não está bem elucidado<sup>39</sup>. Após o consumo crônico de álcool, as células de Kupffer exibem maior concentração de TNF-  $\alpha$  estimulada por LPS<sup>40</sup>.

A citocina anti-inflamatória IL-10 é produzida por macrófagos, linfócitos e células de Kupffer<sup>41</sup>. A IL-10 tem como função controlar a produção endógena de TNF-  $\alpha$  endógena<sup>42</sup> e possui efeito hepatoprotetor na proliferação da fibrose<sup>43</sup>. Em modelo animal deficientes em IL-10, o consumo de álcool leva a um aumento na inflamação no tecido hepático<sup>44</sup>. No entanto, é difícil descartar se a lesão hepática observada nesse estudo é causada por etanol ou toxinas como LPS. Assim, o papel da IL-10 na DHA deve ser investigado.

## 2.2 MicroRNAs e DHA

### 2.2.1 Biogênese e Função dos MicroRNAs

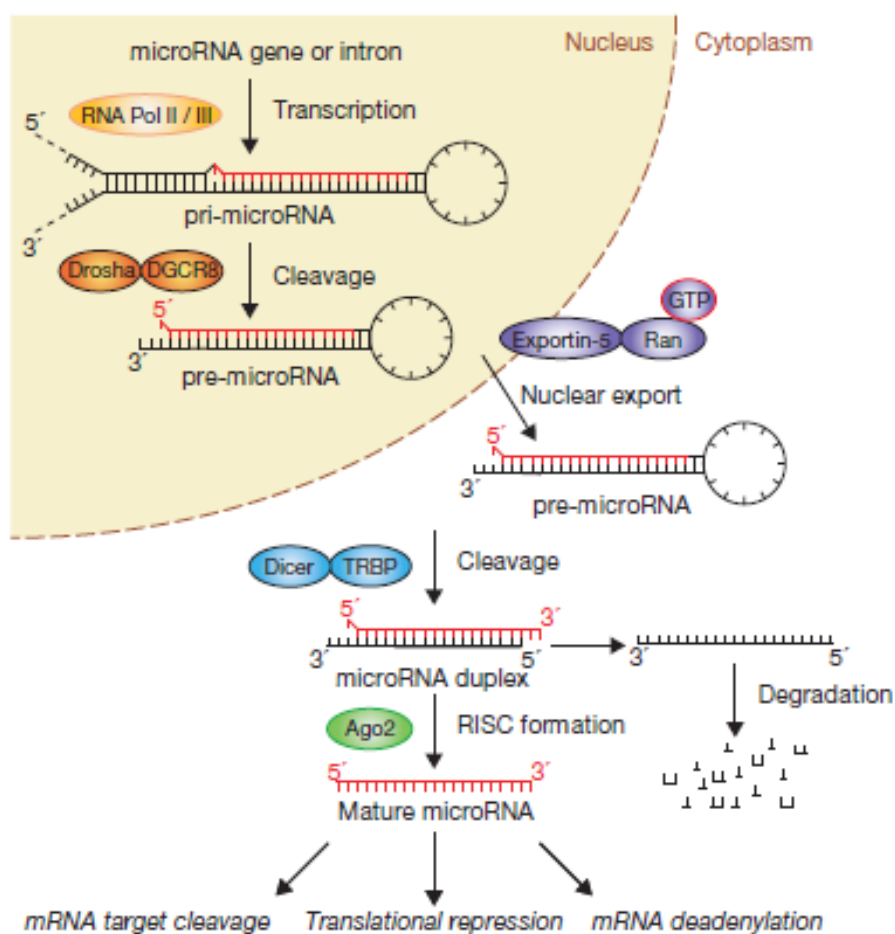
Nos últimos anos os estudos acerca do papel de microRNAs vêm crescendo amplamente em diversas comorbidades<sup>7; 45; 46</sup>. Devido a sua estabilidade e facilidade de serem encontrados, os tornam alvos como possíveis biomarcadores e na terapêutica de diversas doenças<sup>8</sup>.

Os microRNAs foram descobertos em 1993 por Lee *et al.*, no nematódeo *Caenorhabditis elegans* quando o gene *lin-4* não foi traduzido em uma proteína biologicamente ativa. Mais tarde, juntamente com Wightman *et al* verificaram que o RNA desse gene possuía complementariedade a múltiplos locais na região 3'UTR e após diversas pesquisas e estudos foi verificada a existência desses pequenos RNAs, que foram denominados de microRNAs<sup>47; 48; 49</sup>.

Com o avanço da biologia molecular, foi possível descobrir que os DNAs nem sempre produzem RNAs codificantes e por consequência sínteses de proteínas<sup>50</sup>. De um modo geral, os RNAs não-codificantes são divididos em alguns sub-tipos: RNAs de transcrição, pequenos RNAs, que são subdivididos em siRNAs, microRNAs, snoRNAs e recentemente RNAs não-codificadores longos. Os microRNAs têm como uma de suas principais funções o silenciamento do RNA, que o leva a reprimir a expressão de seus genes alvos, mostrando assim toda a sua importância em diversas patologias<sup>51</sup>.

Os microRNAs são moléculas de cadeia simples, de aproximadamente 18-24 nucleotídeos não codificantes, que regulam a expressão de seus RNAs mensageiros alvos<sup>8</sup>. Grande parte dos microRNAs são gerados dentro do núcleo celular pela RNA

Polimerase II como transcritos primários longos (pri-microRNAs) que formam uma estrutura de forquilha<sup>52</sup>. Posteriormente a RNase III Drosha processa os pri-microRNAs em *hairpins* de 70-100 nucleotídeos chamados pré-microRNAs. Estes são exportados ao citoplasma através da exportina-5<sup>53</sup> e processados por outra RNase II, a *Dicer*. O resultado deste processo é um microRNA maduro de dupla fita de 22 nucleotídeos<sup>54; 55</sup> (Figura 4).



**Figura 4:** Via metabólica dos microRNAs. O microRNA é primeiro transcrito em pri-microRNA pela RNA Pol II/III após é clivado pelo complexo Drosha-DGCR2 a pré-microRNA no núcleo. A *hairpin* percussora é exportada para o citoplasma através da exportina-5. No citoplasma, o complexo Dicer-TRBP cliva, o pre-microRNA resultando em um microRNA fita dupla. Assim, esse microRNA maduro é incorporado no complexo RISC onde irá interagir ao mRNA alvo ocasionando a interrupção do processo inicial de tradução, a indução de sua clivagem, ou ambos. Fonte Winter *et al.*, (2009)<sup>54</sup>.

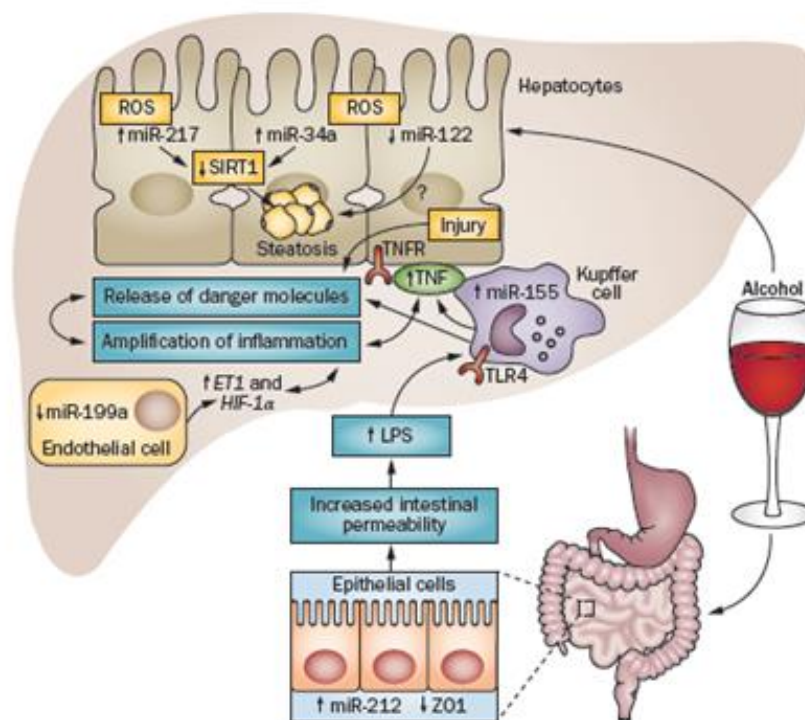
Assim, este microRNA maduro será incorporado ao complexo RNA-RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*). Onde somente uma das fitas é incorporada neste complexo, a qual vai reconhecer e interagir como as extremidades 3'UTR e 5'UTR (do inglês *untranslated region*) do mRNA alvo<sup>56</sup>, ocasionando a interrupção do processo inicial de tradução. Impossibilitando que os ribossomos traduzam a informação do mRNA alvo para uma proteína ou realizar a indução de sua clivagem, ou ambos. A outra fita será degradada pela instabilidade termodinâmica<sup>54; 57</sup>.

Além da localização intracelular, os microRNAs também são encontrados em fluidos corporais, incluindo o soro, plasma, urina e saliva<sup>58</sup>. Evidências sugerem que eles estão presentes na fração proteica, bem como nos exossomos que estão na circulação<sup>59</sup> o que confere sua alta estabilidade. Isto permite quantificar os microRNAs em tecidos específicos e nos fluidos, tornando-se atraentes para a descoberta como biomarcadores em diversas patologias<sup>8</sup>. Até outubro de 2018 foram descritas 38.589 moléculas de microRNAs em plantas, animais e vírus no site miRBase<sup>60</sup> e podem ser utilizadas como alvo para regulação de proteínas nas doenças<sup>7</sup>.

### 2.2.2 miR-122, miR-217 e o miR-155 na DHA

Alguns microRNAs estudados na DHA são os miR-122, miR-217 e o miR-155 (Figura 6)<sup>8; 13</sup>. Os microRNAs quando apresentam expressão anormal parecem caracterizar muitas doenças. Assim, os perfis de expressão de microRNAs podem se tornar excelentes ferramentas de diagnóstico e prognóstico, bem como a sua utilização para futuras terapias gênicas<sup>61</sup>. Os microRNAs têm como função regular os processos biológicos, tipos celulares e influenciar na expressão gênica, incluindo os

processos hepáticos<sup>8; 62; 63</sup>. Alguns microRNAs estudados na DHA são os miR-122, miR-217 e o miR-155 (Figura 5)<sup>8; 13</sup>.



**Figura 5:** Papel dos microRNAs na DHA. O etanol sozinho ou com seus metabólitos aumentam os níveis de miR-212 em células epiteliais do intestino. O excesso de LPS no fígado afeta as células de Kupffer, sistema imunológico, hepatócitos e células endoteliais. Em resposta, as células de Kupffer tornam-se ativas e há a indução de miR-155 e liberação de TNF. O TNF provoca alguns prejuízos nos hepatócitos, e estes danificados liberam moléculas sinalizadoras de perigo, incluindo o miR-122 que são reconhecidas por várias células imunes. A ingestão de álcool também aumenta o estresse oxidativo, o que resulta na regulação positiva de *MIR-34<sup>a</sup>* e miR-217 e o que talvez diminua o miR-122 nos hepatócitos. A desregulação destes microRNAs resulta em esteatose hepática via SIRT1 e outros genes não identificados. Fonte: Szabo e Bala (2013)<sup>8</sup>.

De todos os microRNAs maduros nos hepatócitos, 70% são miRs-122, o que equivale a aproximadamente 130.000 cópias por célula, sendo sua expressão insignificante em outras células e tecidos e é codificado no cromossomo 18<sup>63; 64</sup>.



Estudos têm demonstrado que um aumento da expressão de miR-122 circulante está associado com infecção pelo vírus da Hepatite C, carcinoma hepatocelular (CHC), e falência hepática aguda induzida por álcool<sup>15; 65</sup>. Foi demonstrado também que em humanos a expressão do miR-122 hepático se correlaciona inversamente com metástase de CHC. A redução de miR-122 diminui a viremia do vírus da hepatite C, triglicerídeos séricos e colesterol, sugerindo que o mesmo tem efeitos pleiotrópicos nos hepatócitos e doenças hepáticas<sup>63</sup>. Nos hepatócitos, miR-122 regula diretamente e indiretamente genes envolvidos na exportação e síntese lipídica, bem como na homeostase do colesterol, assim o tornando relevante para o estudo da esteatose hepática<sup>66; 67 59 11, 14</sup>.

Embora exista uma ampla literatura da expressão do miR-122 em distintas doenças hepáticas, na DHA sua expressão ainda é contraditória. Assim, no estudo de Satishchandran *et al*, fígados de pacientes com cirrose alcoólica e fígados de camundongos alimentados com álcool, tiveram a expressão do miR-122 significativamente reduzida<sup>63</sup>. Por outro lado, no estudo de McCrae *et al*, foi verificado que indivíduos que ingeriram bebidas alcoólicas, a expressão de miR-122 em amostras de sangue teve um aumento de 1,95 vezes quando comparado a amostras antes da ingestão do álcool<sup>68</sup>.

A esteatose é o primeiro estágio de dano hepático na DHA. O acúmulo de lipídios como triglicerídeos nos hepatócitos gera uma superoxidação de lipídios e estresse oxidativo, o que resulta em apoptose e inflamação hepática<sup>69</sup>. Um dos microRNAs que majoritariamente está envolvido com a inflamação e é regulador de respostas imunes no tecido hepático é o miR-155, o qual desempenha um papel em relação com as citocinas pró-inflamatórias<sup>56; 59</sup>. O miR-155 é codificado e processado

a partir de um exon não-codificante de RNA, transcrito a partir *B-cell integration Cluster* localizado no cromossomo 21<sup>70</sup>. Evidências crescentes indicam que o miR-155 está envolvido em diversos processos biológicos, incluindo hematopoese, inflamação e imunidade<sup>46</sup>.

A alteração da expressão de miR-155 foi relatada em modelos animais com hepatite alcoólica <sup>71</sup>. Estudos apontam para o papel promotor do álcool sobre o aumento de expressão de miR-155. Bala *et al.* encontraram níveis aumentados de miR-155 nas células de Kupffer em modelo animal de DHA, indicando que esse microRNA estaria envolvido na resposta inflamatória de macrófagos<sup>59; 71</sup>. O miR-155, entretanto, parece desempenhar um importante papel no desencadeamento da resposta inflamatória da DHA regulando a expressão de NF-κB (do inglês *nuclear factor kappa-*) e TNF-α. Por outro lado, o miR-155 também regula a expressão do PPAR-α e PPAR-γ (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor*) que regulam a esteatose alcoólica através de seus efeitos na via do metabolismo lipídico <sup>71; 72 73</sup>.

Estudos recentemente demonstraram que a Sirtuína 1 (SIRT 1) SIRT1 é um dos alvos mais importantes da ação do etanol no fígado<sup>74; 75</sup>. O miR-217 está relacionado com o metabolismo de lipídios através da via da Sirtuína 1 (SIRT1), proteína responsável pela regulação do metabolismo de lipídios através da desacetilação e modificação de resíduos de lisina nos reguladores transcricionais<sup>12; 13</sup>. A exposição crônica ao etanol inibe a transcrição de SIRT1 levando a um excesso de acúmulo de lipídios nos hepatócitos<sup>12; 13</sup>. Em outro estudo dos mesmos autores foi relatado que a expressão de miR-217 está correlacionado com o aumento de citocinas inflamatórias, mostrando assim que o miR-217 desempenha papel crítico na regulação da inflamação hepática alcoólica<sup>13</sup>.

Assim, embora o miR-122 seja o mais estudado nas doenças hepáticas, inclusive na DHA, os resultados de sua expressão ainda são controversos. Entretanto, os estudos relacionados a miR-155 e ao miR-217 e sua associação com a DHA são escassos. Os estudos para entender as funções dos microRNAs tem muitos aspectos potenciais que podem ser utilizados para a melhoria de tratamentos e no cuidado de pacientes com DHA<sup>7</sup>. As perspectivas dos microRNAs no desenvolvimento de tratamentos de patologias vem se destacando, porém ainda é difícil verificar o alvo do microRNA e revelar o seu mecanismo de ação nas doenças, especialmente na DHA<sup>7</sup>. Conseqüentemente, os avanços nas pesquisas sobre os microRNAs se tornam necessários para entender melhor os mecanismos envolvidos nas doenças, assim como possíveis alvos terapêuticos e marcadores mais sensíveis e específicos.

### 2.3 Modelos Experimentais de DHA

Para o estudo da DHA existem alguns modelos experimentais semelhantes com o que ocorre na clínica para diversos aspectos da DHA. As primeiras tentativas de estudar DHA em modelos animais começaram no ano de 1950, usando principalmente roedores e primatas<sup>76</sup>.

Atualmente, há progresso significativo no desenvolvimento de modelos, com os quais, visam investigar os mecanismos de início e progressão da DHA. Para que um modelo seja eficaz, é necessário que ele possa replicar a etiologia e história natural da doença humana <sup>77</sup>. Os animais mais utilizados como modelos de DHA são os roedores, principalmente ratos e camundongos, porém tais modelos ainda não exibem o espectro completo da DHA como em humanos <sup>78 79</sup>.

Várias hipóteses estão sendo geradas para explicar essa discrepância da lesão hepática entre humanos e roedores após a exposição ao etanol. Notavelmente, a

maioria dos roedores tem uma aversão natural ao álcool e tendem a consumir etanol apenas pelas calorias, em vez de terem o desejo de consumir. Os roedores também têm uma taxa catabólica 5 vezes mais rápida do que em humanos <sup>80</sup>. Essas características acabam gerando menos danos aos roedores após a exposição o etanol do que em humanos. A diferença do sistema imune inato também deve ser cuidadosamente considerada como resposta imune, assim como o padrão da inflamação que desempenha um papel crítico na patologia da DHA<sup>81</sup>.

Vários modelos empregando roedores foram estabelecidos para investigar os efeitos tanto da exposição aguda, quanto da exposição crônica ao etanol, para avaliar o início e progressão da DHA. Para conseguir um modelo ideal de DHA, deve se considerar fatores como: quantidade de álcool, via de administração, tempo de duração e a espécie animal. A quantidade e duração do etanol que o animal recebe devem ser suficientes para manter um nível de concentração de álcool no sangue e por tempo suficiente para criar uma lesão aguda ou crônica <sup>82; 83; 84</sup>.

Um das primeiras dietas projetadas para estudar o efeito do consumo de álcool *in vivo* é a dieta líquida de Lieber-DeCarli. Esta dieta foi introduzida pela primeira vez por Lieber em 1963, quem realizou diversos estudos para entender o porquê que apenas o álcool sozinho não produzia danos ao fígado. Foi demonstrado que quando os ratos recebiam dieta adequada, a absorção do álcool era insuficiente para causar danos significativos ao fígado, devido à aversão natural dos roedores ao álcool. E assim foi verificado que eles poderiam combater essa aversão em uma dieta líquida contendo etanol sem nenhum outro alimento ou bebida <sup>85; 86; 87</sup>. Esta dieta em modelos crônicos se mostrou útil para estudos de estágios iniciais da DHA e no efeito do álcool nas alterações metabólicas hepáticas <sup>87</sup>.

Outro modelo alcoólico utilizado em roedores é a dieta *ad libitum*, onde o álcool é administrado na água das garrafas e é a única fonte de água dos animais, juntamente com uma dieta padrão que, os animais têm como livre acesso<sup>88</sup>. Este modelo se mostra de fácil manipulação, pois se tem a concentração precisa do etanol na água. Possui limitações, pois não é possível que os roedores atinjam elevada concentração alcoólica<sup>89; 90</sup>.

O modelo de infusão intragástrica de Tsukamoto-French desenvolvido em 1984 é utilizado quando é preciso superar as limitações de outras dietas que apenas produzem danos iniciais da DHA (esteatose). No entanto, nesse modelo há diversas desvantagens, visto que necessita implantar um tubo intragástrico, o cuidado dos animais no pós-operatório é rigoroso para evitar contaminação, entre outros<sup>90</sup>.

Até o momento, nenhum estudo descrito mostrou algum modelo de etanol em roedores que efetivamente se tem lesões mais graves da doença como a hepatite alcoólica, fibrose e cirrose que não haja adição de um agente secundário. Assim é necessário cautela na interpretação de dados destes modelos em relação ao estado da doença em humanos<sup>78</sup>.

### 2.3.1 Zebrafish e Modelos de DHA

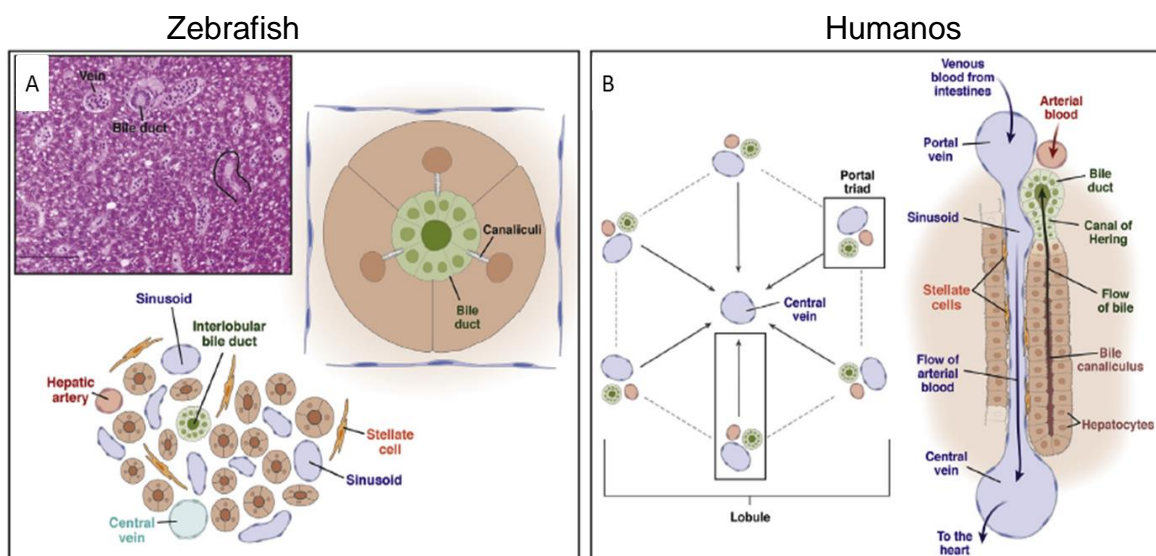
O zebrafish (*Danio rerio*) (Figura 4) é um peixe de água doce que tem entre 3 a 4 centímetros, vem sendo amplamente utilizado como modelo experimental em pesquisas científicas de diversas doenças<sup>91</sup>. Este peixe foi descoberto pela primeira vez no Rio Ganges na Índia, no final do século 19<sup>92</sup> e seu uso é devido à facilidade na manutenção, manipulação e baixos custos. São animais pequenos e ocupam espaços físicos menores, têm curto ciclo de vida, possuem homologia anatômica, imunológica, fisiológica e molecular com mamíferos<sup>16; 93</sup>.

Após 96 horas de fertilização, o zebrafish pode ser comparado com um embrião humano de três meses <sup>94</sup>. Seu genoma foi inteiramente sequenciado, o que o torna um ótimo modelo animal para estudos moleculares<sup>16; 18</sup>.



**Figura 6:** Zebrafish (*Danio rerio*): peixe teleosteo de água doce de fácil manutenção, rápida reprodução e baixos custos de manutenção.

Em comparação com os mamíferos, a arquitetura hepática e celular no zebrafish são únicas. O fígado do zebrafish é organizado em 3 lóbulos contíguos (2 laterais e 1 ventral) e estes não possuem o pedículo que separa os lobos nos mamíferos. O zebrafish não possui sistema portal, os hepatócitos no fígado do peixe estão dispostos em túbulos, com ductos biliares circulando entre 2 filas de hepatócitos <sup>95; 96; 97</sup> (Figura 7A e 7B). Suas membranas apicais estão voltadas para o interior do túbulo e os sinusóides voltados para o lado basal dos hepatócitos (Figura 7B).



**Figura 7:** Comparação da anatomia do fígado do zebrafish e do ser humano. 7A Histologia e arquitetura hepática do zebrafish. 7B: Arquitetura hepática humana. Fonte Goessling e Sandler, 2015<sup>18</sup>.

No zebrafish, com exceção das células de kupffer, que são as células imunes hepáticas, todos os outros tipos celulares hepáticos dos mamíferos foram identificados. Além disso, as células hepáticas do zebrafish apresentam semelhanças com os mamíferos e desempenham as mesmas funções, incluindo a secreção biliar, armazenamento de glicogênio e lipídios, resposta à insulina, metabolismo e secreção de proteínas séricas<sup>98; 99; 100</sup>.

É imprescindível destacar que um determinante da suscetibilidade às doenças entre espécies é a variação genética. Os mesmos fatores de variações no fenótipo e respostas a fatores ambientais em humanos, incluindo polimorfismos genéticos e fatores epigenéticos, alteram a suscetibilidade para doenças no zebrafish<sup>101</sup>. Já foi demonstrado, por exemplo, que as variações na suscetibilidade do zebrafish frente à esteatose induzida pelo álcool ou por lesão tóxica mediada por acetamiofeno são semelhantes aos seres humanos<sup>17; 102</sup>.

Assim, o zebrafish apresenta similaridade com os humanos, tanto na composição celular hepática, respostas imunes, função, sinalização e resposta a lesão, bem como os processos celulares nas doenças hepáticas. Os genes desses peixes são altamente conservados em relação com os genes dos humanos, o que torna o zebrafish um modelo útil para estudar os mecanismos básicos da doença hepática<sup>18</sup>.

É importante ressaltar o fácil manuseio nos modelos de álcool com zebrafish, sendo necessário apenas a adição de etanol na água dos aquários ou placas, onde a água gera exposição contínua, pois os peixes ingerem a água enquanto estão

respirando. Já nos modelos com mamíferos para estudo do efeito do álcool, as alternativas, como já mencionadas, são que os animais bebam *ad libitum* ou que necessitem de infusão intragástrica, gerando muitas desvantagens<sup>103</sup>.

O primeiro modelo de etanol em zebrafish foi descrito em 1971 por Laale *et al*, onde embriões eram expostos por 24 horas em concentrações de etanol graduadas entre 1% a 3% e foi encontrado anormalidades na medula espinhal e olhos<sup>104</sup>. O modelo de DHA em zebrafish foi descrito em 2009 por Passeri *et al*, onde foram expostas larvas de zebrafish ao etanol por 32 horas em uma concentração de 2%. A exposição resultou sinais característicos e iniciais da DHA aguda, que incluíam hepatomegalia, esteatose e alterações na expressão gênica hepática de genes relacionados ao metabolismo lipídico<sup>17</sup>. Em 2012 Jang *et al*, utilizaram zebrafish adultos para estudar a Doença hepática gordurosa alcoólica, para entender como o metabolismo é regulado no decorrer da doença. Os animais foram expostos a concentrações de etanol que variavam de 1% a 2% por 9 horas durante 7 dias. Com a concentração de 1,2%, foi possível verificar que os animais estavam com aumento dos depósitos de lipídios no tecido hepático, sendo essa a concentração utilizada para o estudo do metabolismo da doença<sup>105</sup>. Em 2015 Lin *et al*, desenvolveram um modelo de etanol crônico em zebrafish adultos machos com exposição a 1% de etanol durante 90 dias, foi verificado ao final do estudo que os animais desenvolveram características da esteatose alcoólica e esteato-hepatite, como acúmulo de lipídios nos hepatócitos, balonização e corpos de Mallory<sup>106</sup>.

Em nosso Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG), o modelo de DHA em zebrafish adulto foi padronizado por Schneider *et al*, em 2014, onde animais adultos foram expostos cronicamente ao etanol na



concentração 0,5% adicionado diretamente na água do aquário por 28 dias. Neste modelo, foi possível verificar esteatose hepática e alteração na expressão gênica de *il-1 $\beta$* .<sup>107; 108; 109</sup>. É importante ressaltar que a utilização de peixes adultos permite ao pesquisador a coleta tanto de amostras séricas, como a de tecido hepático em maiores quantidades para as análises.

Cabe destacar que o zebrafish adulto também apresenta sinais de dano hepático quando é exposto a variadas concentrações de etanol por períodos prolongados<sup>105; 107; 110</sup>. Já a utilização de larvas é indicada para estudos de efeitos agudos do álcool, pois as larvas acabam se intoxicando e não conseguem se alimentar<sup>18</sup>. O zebrafish é um modelo adequado para o estudo da DHA, pois apresenta a via de metabolização do álcool e a exposição é facilitada, não sendo necessário um adjuvante para o desenvolvimento da doença, como é necessário em roedores<sup>18</sup>.

## JUSTIFICATIVA

A DHA tem se destacado como uma das principais causas de doença hepática crônica. Acredita-se que o álcool seja responsável por 2,5 milhões de mortes todos os anos. O consumo mundial de álcool varia conforme a cultura e os hábitos da população, sendo que a duração do consumo e a quantidade de álcool ingerida são as causas mais importantes para o desenvolvimento da DHA.

Os estudos acerca do papel de microRNAs vêm crescendo amplamente. Estes têm como função regular os processos biológicos, tipos celulares e influenciar na expressão gênica, incluindo os processos hepáticos. Alguns microRNAs têm sido relacionados à DHA, como o miR-122, miR-217 e o miR-155. Estudos para entender suas funções podem ajudar a explorar seus potenciais usos para a melhoria do diagnóstico, tratamentos e cuidado de pacientes com DHA.

O zebrafish vem sendo utilizado como modelo experimental em pesquisas científicas da DHA devido à facilidade na manutenção, manipulação, baixos custos, curto ciclo de vida e homologia anatômica, imunológica, fisiológica e molecular com mamíferos. Embora os benefícios apresentados do modelo até o momento, não há estudos sobre microRNAs e a DHA.

Assim, este estudo se justifica pela necessidade de avaliar a expressão dos miR-122, miR-155 e miR-217 na DHA em um modelo animal vantajoso como o zebrafish adulto e assim intensificar o uso deste modelo para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na doença, assim como possíveis alvos terapêuticos e marcadores mais sensíveis e específicos.

## **QUESTÃO DE PESQUISA**

A exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto aumentará os níveis de expressão hepáticos e circulantes dos miR-122, miR-155 e miR-217 na DHA?

## **HIPÓTESE**

Os miR-122, miR-155 e miR-217 sofrem aumento na sua expressão hepática e circulante frente a exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão de miR-122, miR-155 e miR-217 em um modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto.

### Objetivos Secundários

- I. Avaliar a histopatologia, acúmulo lipídico hepático e triglicerídeos hepáticos no modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto;
- II. Avaliar as citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 no modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto;
- III. Avaliar a expressão dos miR-122, miR-155 e miR-217 circulante no modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto;
- IV. Avaliar a expressão hepática dos miR-122, miR-155 e miR-217 no modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto.

**ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS**

**MICRORNAS EXPRESSION IN ADULT ZEBRAFISH ON CHRONIC ETHANOL  
EXPOSURE**

Artigo científico submetido à *WORLD JOURNAL OF HEPATOLOGY*,

Qualis A2, com um fator de impacto por publicação de 2.730.

---

**De:** BPG Submission <[submission@wjnet.com](mailto:submission@wjnet.com)>

**Enviado:** quarta-feira, 27 de fevereiro de 2019 15:56

**Para:** [mana.amanda@gmail.com](mailto:mana.amanda@gmail.com)

**Cc:** [ayres.raquel@gmail.com](mailto:ayres.raquel@gmail.com); [lariasselongg@hotmail.com](mailto:lariasselongg@hotmail.com); [losch@ufrgs.br](mailto:losch@ufrgs.br); [marioreis@live.com](mailto:marioreis@live.com); [themis.silveira@gmail.com](mailto:themis.silveira@gmail.com); [carolinaurib10@yahoo.com.ar](mailto:carolinaurib10@yahoo.com.ar); [tresdlima@hotmail.com](mailto:tresdlima@hotmail.com)

**Assunto:** World Journal of Hepatology - Manuscript NO.: 46958

Dear Dr. Pasqualotto,

Thank you for submitting your manuscript to our peer reviewed, online, and open access journal; the details of your submission are listed below:

**Journal:** World Journal of Hepatology

**Manuscript Number:** 46958

**Title:** MicroRNAs expression in adult zebrafish on chronic ethanol exposure

**Column:** Basic Study

**Authors:** Amanda Pasqualotto, Raquel Ayres, Larisse Longo, Diego Del Duca Lima, Diogo Losch de Oliveira, Mário Reis Álvares-da-Silva, Themis Reverbel da Silveira and Carolina Uribe-Cruz

**Received Date:** 2019-02-27

You may track the progress of your manuscript(s) online through the F6Publishing system by clicking on the following link: [www.f6publishing.com](http://www.f6publishing.com), inputting your registered e-mail and user password, and clicking on the "Author Login" button. By clicking on the "My Manuscripts" heading, you can view your manuscript's status.

Please keep a copy of your manuscript when you submit it to the journal. It is not our practice to send the unaccepted manuscript(s) back, although we will issue a notice of the decision to publish to the authors.

About the Article Processing Charge details, please visit our website at: <https://www.wjnet.com/bqg/ggrinfo/242>.

If you have any questions, please feel free to contact us by e-mail at: [submission@wjnet.com](mailto:submission@wjnet.com) OR online at the Help Desk: <http://www.f6publishing.com/helpdesk>.

Best regards,

Xiang Li, Assistant Editor, Editorial Office

**Baishideng Publishing Group Inc**

E-mail: [submission@wjnet.com](mailto:submission@wjnet.com)

Help Desk: <https://www.f6publishing.com/helpdesk>

Online Submission: <https://www.f6publishing.com>

**Name of Journal:** *World Journal of Hepatology*

**Manuscript Type:** BASIC STUDY

**MicroRNAs expression in adult zebrafish on chronic ethanol exposure**

Pasqualotto A *et al.* MicroRNAs in model of chronic ethanol exposure

**Amanda Pasqualotto, Raquel Ayres, Larisse Longo, Diego Del Duca Lima, Diogo Losch de Oliveira, Mário Reis Alvares-da-Silva, Themis Reverbel da Silveira, Carolina Uribe-Cruz**

**Amanda Pasqualotto, Larisse Longo, Mário Reis Alvares-da-Silva, Carolina Uribe-Cruz**, Post Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Amanda Pasqualotto, Raquel Ayres, Larisse Longo, Themis Reverbel da Silveira, Carolina Uribe-Cruz**, Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Center for Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

**Diego Del Duca Lima, Diogo Losch de Oliveira**, Post Graduate Program in Biological Sciences-Biochemistry, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

**ORCID number:** Amanda Pasqualotto ([0000-0002-8273-3499](https://orcid.org/0000-0002-8273-3499)); Raquel Ayres ([0000-0002-7154-0501](https://orcid.org/0000-0002-7154-0501)); Larisse Longo ([0000-0002-4453-7227](https://orcid.org/0000-0002-4453-7227)); Diego Del Duca Lima ([0000-0003-4708-3088](https://orcid.org/0000-0003-4708-3088)); Diogo Losch de Oliveira ([0000-0002-9028-6959](https://orcid.org/0000-0002-9028-6959)); Mário Reis Alvares-da-Silva ([0000-0002-5001-246x](https://orcid.org/0000-0002-5001-246x)); Themis Reverbel da Silveira ([0000-0001-9867-8650](https://orcid.org/0000-0001-9867-8650)); Carolina Uribe-Cruz ([0000-0002-0526-3067](https://orcid.org/0000-0002-0526-3067)).

**Author contributions:** Pasqualotto A and Uribe-Cruz C designed the experiments, performed experiments and analysis and analyzed the data; Ayres R performed the experiments; Longo L contributed to molecular analyzes; Lima DDD contributed to the experiment; Oliveira DL contributed to the experiment; Alvares-da-Silva MR assisted in the study experimental design; Silveira TR assisted in the study



experimental design; The article was written by the first author Pasqualotto A and reviewed by an English-speaking teacher; all the authors contributed with clarifications and orientations in the article; all authors were involved in the editing of the article; all authors have read and approved the final version of the article.

**Supported by** FIPE - HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development).

**Institutional animal care and use committee statement:** The protocols were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (No. 14.0160). The protocols were conducted in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals. Animal care is described in the manuscript.

**Conflict-of-interest statement:** To the best of our knowledge, no conflict of interest exists.

**Data sharing statement:** Technical appendix, statistical code, and dataset available from the corresponding author at mana.amanda@gmail.com. Participants gave informed consent for data sharing. No additional data are available.

**ARRIVE Guidelines statement:** The ARRIVE Guidelines have been adopted.

**Correspondence to:** Amanda Pasqualotto, Biomedical and Master in Gastroenterology and Hepatology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, Brazil. Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350/ sala 12214, 2º andar. CEP 90035-903, Bairro Rio Branco, Porto Alegre, RS - Brazil. Telephone: +55-051-3359.8847; Fax number- +55-051-3359.8760. E-mail: mana.amanda@gmail.com

## BACKGROUND

Excessive alcohol consumption is still one of the leading causes of liver disease worldwide. Studies on the microRNAs role have been growing widely. Although miR-122, miR-217 and miR-155 have been related to alcoholic liver disease, there are still few studies on its expression in the disease and many of them are contradictory.

## AIM

To evaluate the miR-122, miR-155 and miR-217 expression in a chronic exposure to ethanol model in adult zebrafish.

## METHODS

Zebrafish adults wild-type of both sexes were divided into two groups ( $n=281$ ): Ethanol Group (EG), expose to 0.5% v/v in the aquarium water, and Control Group (CG). After 28 days the animals were euthanized and histopathological analysis, quantification of lipids, hepatic triglycerides and inflammatory cytokines were performed in liver tissue. Expression of miR-122, miR-155 and miR-217 was quantified in liver tissue and serum.

## RESULTS

After 28 days of ethanol exposure, the EG group showed hepatic lesion, dislocation of hepatocyte nuclei and increased accumulation hepatic lipid. The expression of *il-1 $\beta$*  showed increase in EG, but *il-10* and *tnf-a* showed no differences between groups. Analysis of hepatic expression of miR-122 and miR-155 was increased in EG, but hepatic miR-217 showed no difference between groups. The miR-155 and miR-217 circulating expression analysis presented a significant increase in EG, however miR-122 did not present difference between the groups.

## CONCLUSION

Chronic exposure to ethanol in adult zebrafish produces an increase in the accumulation of hepatic lipids as well as an increase in circulating expression of miR-155, miR-217 and hepatic expression of miR-122 and miR-155.

Chronic exposure to ethanol in adult zebrafish produces alteration in the expression of circulating and hepatic microRNAs.

**Keywords:** Alcoholic liver disease; miR-122; miR-155; miR-217; Zebrafish; Ethanol.

**Core Tip:** Excessive alcohol consumption continues as one of the leading causes of liver disease worldwide. MicroRNAs are small non-coding RNAs. They are being used for the diagnosis and prognosis of several diseases, including liver diseases. Among the models for liver disease studies, zebrafish has been notable for its many advantages. Our study was the first to evaluate microRNAs in ethanol chronic exposure in zebrafish and we emphasize that they present alterations in their expression and thus can be used for mechanism and therapeutic studies of the disease.

## INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD) is a disorder caused by excessive alcohol consumption. The causal relationship between alcohol intake and ALD is highly developed, both in humans and in experimental models. More than 95% of individuals who suffer from alcohol abuse develop hepatic steatosis. Among them 20-40% progress to inflammation and fibrosis (steatohepatitis) and 5-10% can progress to cirrhosis and hepatocarcinoma<sup>[1]</sup>. According to data from the World Health Organization (WHO) in 2018, it is estimated that 3% of all global deaths are alcohol-related, and its abusive use resulted in 0.4 million of the 11 million deaths worldwide<sup>[2]</sup>, which exemplifies the importance of this public health issue<sup>[3]</sup>.

MicroRNAs are abundant in the liver and regulate several cellular processes associated with liver injury such as inflammation, apoptosis, hepatocyte regeneration, and their dysregulation, may be the pathogenic factor in many liver diseases<sup>[4]</sup>. Several studies have demonstrated the expression profile of altered microRNAs in animal models and/or patients with ALD<sup>[5-8]</sup>. Studies about the role of microRNAs in several pathological entities have been growing widely. These are single-stranded molecules, of approximately 18-24 non-coding nucleotides, that regulate the expression of messenger RNAs<sup>[6]</sup>. MicroRNAs are present in protein fractions and in exosomes which allow them to circulate through body fluids, including serum, plasma, urine and saliva<sup>[9, 10]</sup>.

Among the animal models for ALD study, zebrafish (*Danio rerio*) has become of great interest. They are easy to maintain, to handle and have low costs. One of its main advantages is anatomic, immunological, physiological and molecular homology with mammals<sup>[11, 12]</sup>. The ALD model in zebrafish reproduces outcomes such as hepatic steatosis, increased lipogenesis and hepatomegaly <sup>[13-15]</sup>.

To date, the role of microRNAs in the zebrafish model in ALD has not been explored, so the aim of this study was to evaluate the expression of microRNAs as pathogenic characteristics of the disease in a model of chronic ethanol in adult zebrafish seeking a better understanding of its expression in fact.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

In this study, we used 562 wild-type *Danio rerio* fish of both sexes, all adults with 4 to 5 cm obtained in an aquariums' shop. The animals were submitted to a 14-days adaptation period. The fish were kept in aquariums with a density of 5 fish/liter of water, with light/dark cycle of 10/14 hours and temperature between 28±2°C. The parameters of pH, presence of ammonia, nitrates and nitrites were checked periodically. The animals were fed with frozen artemia (BioArtêmia - Brazil) in the amount of 7% of body weight. This study was conducted in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals (GPPG-HCPA 14-0160, UFRGS 33830).

### *ALD Experimental Model*

The ALD model used was established by Schneider *et al*<sup>[14]</sup>. The animals were divided into two groups ( $n=281$ ): Ethanol Group (EG) and Control Group (CG). EG was exposed to ethanol at a concentration of 0.5% (v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), added directly into the aquarium. The aquariums water was changed every two days to maintain alcohol levels. The CG received the same manipulation, but without exposure to ethanol. Both groups were euthanized 28 days after been exposed or not to ethanol and their biological samples collected.

### *Anesthesia and euthanasia*

After 28 days, the animals were anesthetized with tricaine 160mg/L (L, Sigma Aldrich, Missouri, USA) until there was loss of balance in the presence of opercular movements<sup>[16]</sup>. Afterwards, they were killed by exsanguination<sup>[17]</sup> and the liver and blood were properly collected and stored for further analysis, according to the protocol of each technique.

### *Histopathological analysis and evaluation of lipid content in the liver*

Hepatic tissue samples were fixed in Tissue Tek® O.T.C. Compound (Sakura, California, USA), cryosectioned (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) (3-5 µm) and stained with H&E and with Oil Red (5mg/mL in propylene glycol) to evaluate the presence of lipids. All sections were examined under an optical microscope. Microphotographs were used to record the samples ( $n=5$ ).

The quantification of lipid deposits in the liver was performed using the modified protocol of Gómez-Lechon *et al*<sup>[18]</sup>. Previously, hepatic tissues were homogenized with PBS (20mg tissue/ml) and incubated with 1µl of the Nile Red solution (1mg/ml in acetone) (Sigma-Aldrich, WGK Germany) for 15 min at 37 °C. Fluorescence was measured at 488 nm of excitation and 550 nm of emission (SpectraMax M3). Obtained results were normalized from total proteins obtained by the Bradford method<sup>[19]</sup> present in the homogenate ( $n=8$ ).

Doses of hepatic triglycerides were performed using kits (Labtest S.A, Brazil)<sup>[20]</sup> according to the manufacturer's instructions. Four pools of 3 livers were used for each group.

#### ***Evaluation of the gene expression of inflammatory cytokines***

Nine pool of 5 livers was used for analyzes. RNA from hepatic tissue was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Germany) and converted into cDNA through the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Lithuania) using random primers. The hepatic gene expression of *il-1β*, *il-10* and *tnf-α* was evaluated by TaqMan probes (Applied Biosystems, United States) (Table 1) and *ef1a* was used as the endogenous gene. The values were calculated by the formula ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ( $n=9$  pools).

#### ***Evaluation of microRNA expression***

Serum was isolated from the blood collected by centrifugation at 3500 rpm (Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific) for 15 minutes. A pool of serum of 15 fish and a pool of liver of 5 fish was performed for analysis. MicroRNA was extracted from serum and hepatic tissue using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen®, Germany) and converted to

cDNA through the TaqMan MicroRNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems™, Lithuania) using specific primers. The miR-122, miR-155 and miR-217 expression was assessed by qRT-PCR with TaqMan MicroRNA Assays probes (Applied Biosystems™, United States) (Table 1) and *dre-let-7d* was used as the endogenous gene. Values were calculated by the formula ( $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ ) (serum  $n=10$  pools, liver  $n = 9$  pools).

Table1. TaqMan Assays:

<b>Gene</b>	<b>Assay ID</b>
<i>hsa-miR-122</i>	dre-miR-122
<i>hsa-miR-155</i>	dre-miR-155
<i>dre-miR-217</i>	dre-miR-217
<i>dre-let-7d</i>	dre-let-7d-5p
<i>il1b</i>	Dr03114368_m1
<i>il10</i>	Dr03103209_m1
<i>tnfa</i>	Dr03126850_m1
<i>ef1a111</i>	Dr03432748_m1

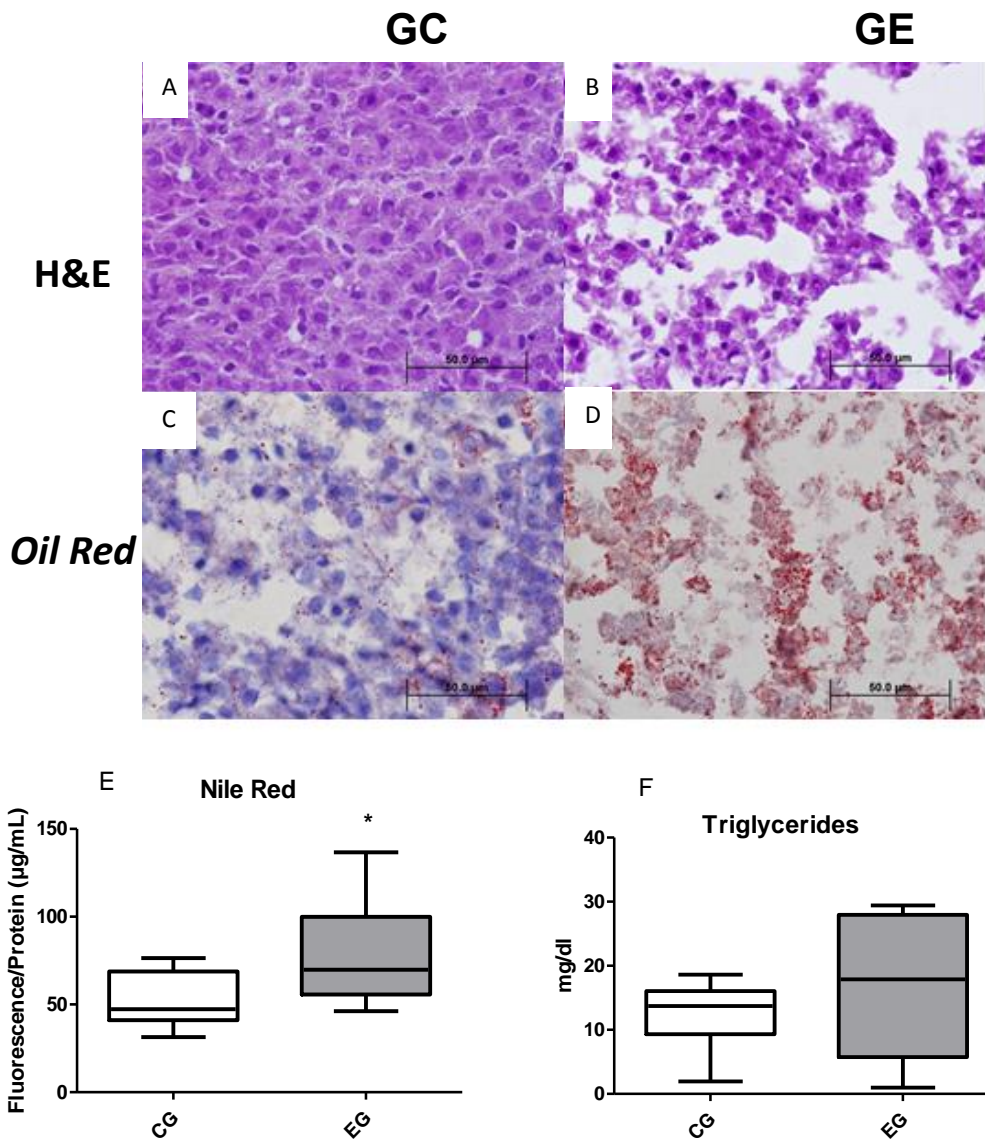
### ***Statistical analysis***

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

## **RESULTS**

### ***Histopathology, lipid deposits and hepatic triglycerides***

The use of 0.5% (v/v) ethanol was effective in inducing hepatic steatosis in animals exposed chronically for 28 days. The EG showed liver damage and displacement of nuclei to the periphery of cells as well as lipid accumulation in comparison with CG (Fig 1A-D). This increase was confirmed with quantification of lipid accumulation with the Nile Red technique (77.7 vs 52.2;  $p=0.046$ ) (Fig 1E). The quantification of triglycerides showed an increase in EG ( $n=4$ ) when compared to CG ( $n=4$ ), but the difference was not statistically significant (Fig 1F).

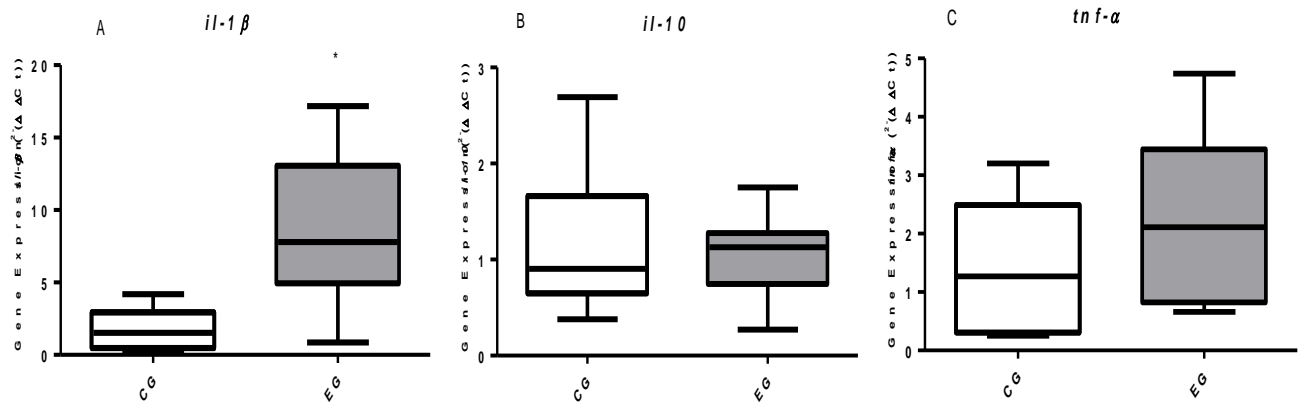


**Figure 1. Histopathological aspects, lipid accumulation and hepatic triglycerides.** A and B staining with H&E. C and D staining with Oil Red. A and C CG, B and D EG 100x. E) Quantification by Nile Red of the accumulation of hepatic lipids. F) Liver triglycerides. Data expressed as min to max. \*Significant statistical difference between CG and EG; CG: control group; EG: ethanol group.

### *Hepatic inflammatory parameters*



The quantification of the *il-1 $\beta$*  gene expression showed a significant increase in the EG of 4.9 times more when compared to the CG ( $p = 0.003$ ) (Fig 2A). No significant difference was observed in the hepatic expressions of *il-10* and *tnf-a* between groups (Fig 2B and 2C).

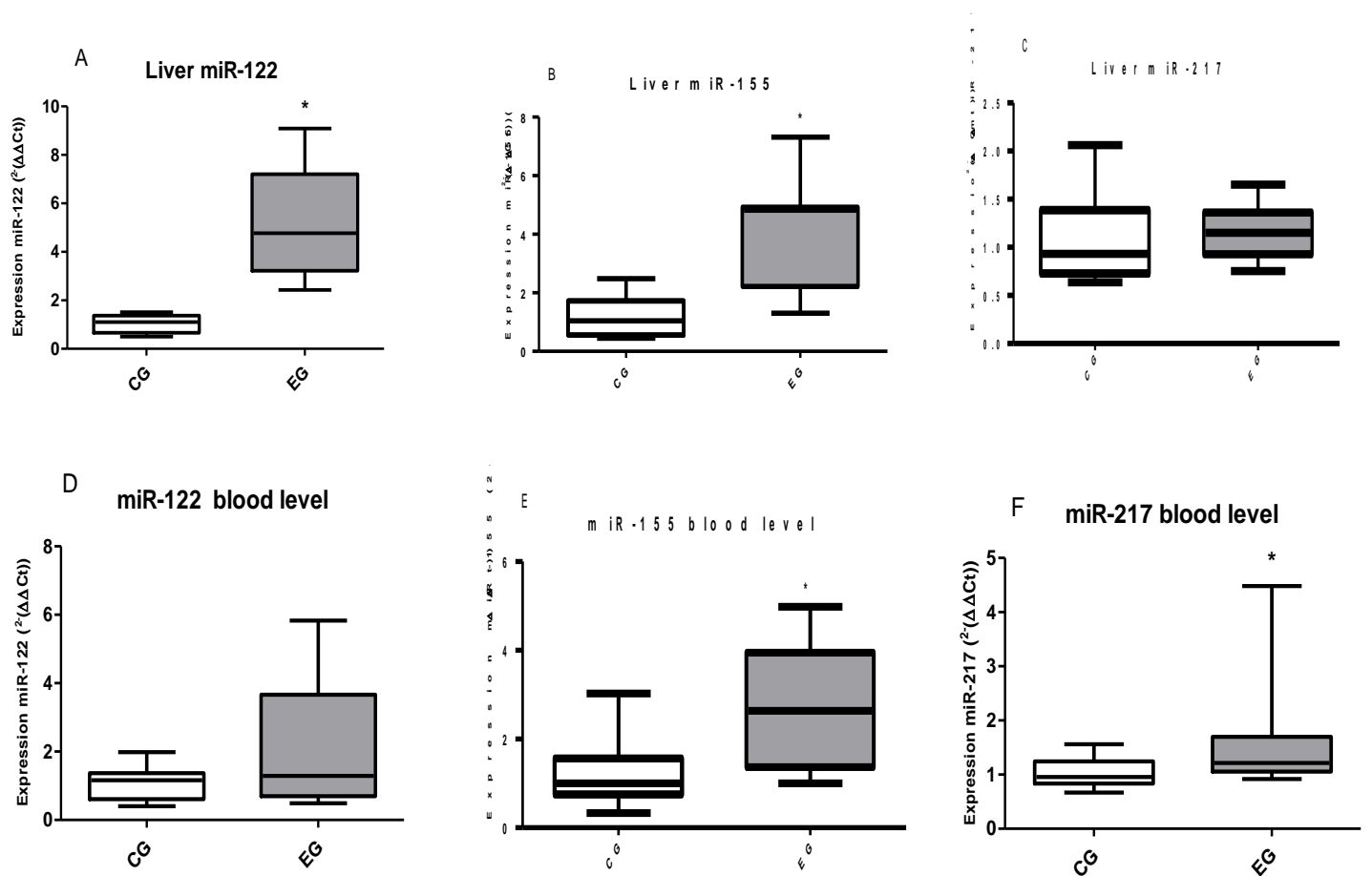


**Figure 2.** Hepatic gene expression of A: *il-1 $\beta$*  B: *il-10* and C: *tnf- $\alpha$* . Data expressed as mean and min to max. \*Significant statistical difference between CG and EG; CG: control group; EG: ethanol group. *Il-1 $\beta$*  Interleukin 1 Beta; *Il-10*: Interleukin 10; *TNF- $\alpha$* : Tumor necrosis factor alpha.

### *Expression of hepatic and circulating microRNAs*

When evaluating the expression of hepatic miR-122 and miR-155, a significant increase of 4.9 and 3.5 times, respectively, was observed in the EG compared to the CG ( $p < 0.001$  and  $p = 0.002$ ). The hepatic miR-217 expression showed an increase in EG, it was not statistically significant (Fig 3A-C).

Expression of circulating miR-122 did not show a significant difference between the groups, but the EG showed an increase in expression of circulating miR-155 and miR-217 of 2.4 and 1.5 times respectively when compared to CG ( $p = 0.007$  e  $p = 0.041$ ) (Fig 3 DF).



**Figure 3.** A-C) Expression of miR-122, miR-155 and hepatic miR-217 respectively. D-F) Expression of circulating miR-122, miR-155 and miR-217 respectively. \*Significant statistical difference between CG and EG; Data expressed as mean and min to max. CG control group; EG: ethanol group.

## DISCUSSION

In recent years zebrafish has become an important and interesting animal model for the study of several diseases, among them hepatic diseases, such as, for example, steatosis, ALD, non-alcoholic fatty liver disease [14, 21-24]. The model of chronic liver disease by ethanol in zebrafish is already well established, showing easy application, requiring only 28 days of exposure to ethanol [14, 25]. Study of microRNAs in this model

has a high potential to determine its expression profile and can be used as a tool for diagnosis and possible therapeutic targets.

After 28 days of chronic exposure to ethanol, our results showed the effectiveness of the ALD model through accumulation of lipids and liver damage. These findings are in agreement with several studies that evaluate different concentrations of ethanol using adult larvae or zebrafish [14, 15, 26-30].

Ethanol induced hepatic injury is mediated by an inflammatory response involving the innate immune system and is associated with increased production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines<sup>[31-33]</sup>. Some studies have shown that IL-1 $\beta$  activation acts on the pathogenesis of alcohol-induced inflammation in the liver<sup>[34, 35]</sup>. Our results showed increased gene expression in *il-1 $\beta$*  hepatic tissue in EG, suggesting that the animals developed an inflammatory process. TNF- $\alpha$ , a cytokine involved in processes of systemic inflammation, plays an important role in the mediation of physiological processes, such as inflammation, cell proliferation and apoptosis<sup>[36]</sup>. The gene expression of *tnf-a* was increased in EG, but its increase was not significant. The anti-inflammatory cytokine IL-10 plays a key role in ALD, controlling the production of endogenous TNF- $\alpha$  and has a hepatoprotective effect on fibrosis proliferation. In agreement with Schneider *et al*<sup>[37]</sup>, no differences were observed in *il-10* expression between the groups. Sepulcre *et al*<sup>[38]</sup> suggested that zebrafish may respond with less sensitivity to LPS, and has a less intense anti-inflammatory response.

Recently, microRNAs have been extensively studied in ALD<sup>[5, 39-41]</sup>. The miR-122 is liver specific, and there is evidence that it plays an essential role in the regulation of hepatocyte differentiation<sup>[42]</sup>. The results on miR-122 expression in the literature are still contradictory. In our study, after exposure to ethanol for 28 days, increased hepatic expression of miR-122 was observed, but the circulating form of miR-122 did not present significant difference between groups. These data agrees with the study by Dippold *et al*<sup>[40]</sup> who studied the exposure of rats to ethanol and found an increase in hepatic miR-122 expression in these animals. However, Satishchandran *et al*<sup>[5]</sup> evaluated livers of patients with alcoholic cirrhosis, verifying a decrease in miR-122 expression. These authors also evaluated mice under the Lieber-DeCarli diet and also

found a decrease in hepatic miR-122 in the exposed group in relation to the control group. On the other hand, Bala *et al*<sup>[6]</sup> used rats as a ALD model and induced the animals for 35 days with the Lieber-DeCarli diet. Results showed an increase in circulating levels of miR-122. Further studies are needed to help define the role of miR-122 in DHA.

The miR-155 is related to inflammatory processes<sup>[4]</sup> and we found in our study an increase in its hepatic and circulating expression in the GE. These findings are consistent with the studies by Bala *et al*<sup>[6]</sup> which observed a significant increase in circulating miR-155 expression, suggesting that alcohol consumption not only provoked accumulation of lipids in the liver, but also resulted in inflammation. Another study from the same group also showed an increase in circulating miR-155 in mice receiving the Lieber-DeCarli diet, together with the increase of TNF- $\alpha$  in hepatocytes *in vitro*<sup>[43]</sup>.

Regarding miR-217 related to lipid metabolism inhibiting the SIRTUIN 1 (SIRT1) pathway <sup>[7, 41]</sup>, in our study, although hepatic miR-217 had no significant difference between the groups, we reported an increase in the circulating form of miR-217 in EG. Yin *et al*<sup>[7]</sup> evaluated the role of miR-217 in regulating the effects of ethanol on the AML-12 cell line and livers of chronically ethanol-treated mice. They found an increase in miR-217 levels and an excess of fat accumulation in the cells. According to the authors, miR-217 impairs the functions of LIPIN-1 in hepatocytes. In another study, the same authors evaluated the role of miR-217 in ethanol, LPS responses, or a combination of both in RAW 264.7 macrophages and isolated cells from mouse liver. In macrophages, ethanol increased the expression of LPS-mediated miR-217 and the production of pro-inflammatory cytokines compared to only LPS or ethanol. The authors suggest that miR-217 is an essential regulator involved in hepatic inflammation induced by ethanol<sup>[7]</sup>. These data suggest that miR-217 is a specific target of ethanol action in the liver and may present as a potential therapeutic target for the treatment of human alcoholic fatty liver disease<sup>[41]</sup>.

Our results are the first to show that expression of miR-122, miR-155 and miR-217 is altered in adult zebrafish on exposure to chronic ethanol. These results are in

agreement with the accumulation of lipids in the hepatic tissue and with the altered expression of inflammatory cytokines. These findings suggest that microRNAs may be possible tools can thus be used for mechanism and therapeutic studies of the disease biomarkers of liver damage produced by chronic exposure to ethanol. We believe, therefore, that this model is suitable for future ALD mechanism, pathophysiology and therapeutic studies.

## REFERENCES

- 1 Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011: 1572 [PMID: 21920463 10.1053/j.gastro.2011.09.002: 10.1053/j.gastro.2011.09.002]
- 2 WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
- 3 Grittner U, Kuntsche S, Graham K, Bloomfield K. Social inequalities and gender differences in the experience of alcohol-related problems. *Alcohol Alcohol*. 2012: 597 [PMID: 22542707 10.1093/alcalc/ags040: 10.1093/alcalc/ags040]
- 4 Xu T, Li L, Hu HQ, Meng XM, Huang C, Zhang L, Qin J, Li J. MicroRNAs in alcoholic liver disease: Recent advances and future applications. *J Cell Physiol*. 2018: [PMID: 30076710 10.1002/jcp.26938: 10.1002/jcp.26938]
- 5 Satishchandran A, Ambade A, Rao S, Hsueh YC, Iracheta-Vellve A, Tornai D, Lowe P, Gyongyosi B, Li J, Catalano D, Zhong L, Kodys K, Xie J, Bala S, Gao G, Szabo G. MicroRNA 122, Regulated by GRLH2, Protects Livers of Mice and Patients From Ethanol-Induced Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018: 238 [PMID: 28987423 10.1053/j.gastro.2017.09.022: 10.1053/j.gastro.2017.09.022]
- 6 Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, Alao H, Kodys K, Szabo G. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology*. 2012: 1946 [PMID: 22684891 10.1002/hep.25873: 10.1002/hep.25873]
- 7 Yin H, Liang X, Jogasuria A, Davidson NO, You M. miR-217 regulates ethanol-induced hepatic inflammation by disrupting sirtuin 1-lipin-1 signaling. *Am J Pathol*. 2015: 1286 [PMID: 25797648 10.1016/j.ajpath.2015.01.030: 10.1016/j.ajpath.2015.01.030]
- 8 McCrae JC, Sharkey N, Webb DJ, Vliegenthart AD, Dear JW. Ethanol consumption produces a small increase in circulating miR-122 in healthy individuals. *Clin Toxicol (Phila)*. 2016: 53 [PMID: 26574140 10.3109/15563650.2015.1112015: 10.3109/15563650.2015.1112015]
- 9 Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010: 1733 [PMID: 20847327 10.1373/clinchem.2010.147405: 10.1373/clinchem.2010.147405]
- 10 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc*

Natl Acad Sci U S A. 2008: 10513 [PMID: 18663219 10.1073/pnas.0804549105: 10.1073/pnas.0804549105]

11 McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov Today*. 2008: 394 [PMID: 18468556 10.1016/j.drudis.2008.03.002: 10.1016/j.drudis.2008.03.002]

12 He JH, Guo SY, Zhu F, Zhu JJ, Chen YX, Huang CJ, Gao JM, Dong QX, Xuan YX, Li CQ. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013: 25 [PMID: 23128142 10.1016/j.vascn.2012.10.003: 10.1016/j.vascn.2012.10.003]

13 Lin JN, Chang LL, Lai CH, Lin KJ, Lin MF, Yang CH, Lin HH, Chen YH. Development of an Animal Model for Alcoholic Liver Disease in Zebrafish. *Zebrafish*. 2015: 271 [PMID: 25923904 10.1089/zeb.2014.1054: 10.1089/zeb.2014.1054]

14 Schneider AC, Machado AB, de Assis AM, Hermes DM, Schaefer PG, Guizzo R, Fracasso LB, de-Paris F, Meurer F, Barth AL, da Silveira TR. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish*. 2014: 371 [PMID: 24987799 10.1089/zeb.2013.0968: 10.1089/zeb.2013.0968]

15 Lai Y, Zhou C, Huang P, Dong Z, Mo C, Xie L, Lin H, Zhou Z, Deng G, Liu Y, Chen Y, Huang S, Wu Z, Sun X, Gao L, Lv Z. Polydatin alleviated alcoholic liver injury in zebrafish larvae through ameliorating lipid metabolism and oxidative stress. *J Pharmacol Sci*. 2018: 46 [PMID: 30245287 10.1016/j.jphs.2018.08.007: 10.1016/j.jphs.2018.08.007]

16 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: 785 [PMID: 19930828]

17 Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. Anesthesia and Restraint of Laboratory Fish. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*: Elsevier; 2008. p. 519-534.

18 Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact*. 2007: 106 [PMID: 17188672 10.1016/j.cbi.2006.11.004: 10.1016/j.cbi.2006.11.004]

19 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976: 248 [PMID: 942051]

- 20 Pedroso GL, Hammes TO, Escobar TD, Fracasso LB, Forgiarini LF, da Silveira TR. Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. *J Vis Exp*. 2012: e3865 [PMID: 22664657 10.3791/3865: 10.3791/3865]
- 21 Wolf JC, Wolfe MJ. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol Pathol*. 2005: 75 [PMID: 15805058 10.1080/01926230590890187: 10.1080/01926230590890187]
- 22 Shimada Y, Kuninaga S, Ariyoshi M, Zhang B, Shiina Y, Takahashi Y, Umemoto N, Nishimura Y, Enari H, Tanaka T. E2F8 promotes hepatic steatosis through FABP3 expression in diet-induced obesity in zebrafish. *Nutr Metab (Lond)*. 2015: 17 [PMID: 26052340 10.1186/s12986-015-0012-7: 10.1186/s12986-015-0012-7]
- 23 Yeh KY, Lai CY, Lin CY, Hsu CC, Lo CP, Her GM. ATF4 overexpression induces early onset of hyperlipidaemia and hepatic steatosis and enhances adipogenesis in zebrafish. *Sci Rep*. 2017: 16362 [PMID: 29180630 10.1038/s41598-017-16587-9: 10.1038/s41598-017-16587-9]
- 24 Schlegel A. Studying non-alcoholic fatty liver disease with zebrafish: a confluence of optics, genetics, and physiology. *Cell Mol Life Sci*. 2012: 3953 [PMID: 22678663 10.1007/s00018-012-1037-y: 10.1007/s00018-012-1037-y]
- 25 Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000: 773 [PMID: 11166068]
- 26 Howarth DL, Passeri M, Sadler KC. Drinks like a fish: using zebrafish to understand alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011: 826 [PMID: 21284674 10.1111/j.1530-0277.2010.01407.x: 10.1111/j.1530-0277.2010.01407.x]
- 27 Tran S, Nowicki M, Chatterjee D, Gerlai R. Acute and chronic ethanol exposure differentially alters alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activity in the zebrafish liver. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015: 221 [PMID: 25290637 10.1016/j.pnpbp.2014.09.011: 10.1016/j.pnpbp.2014.09.011]
- 28 Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*. 2009: 443 [PMID: 19127516 10.1002/hep.22667: 10.1002/hep.22667]
- 29 Zhou C, Lai Y, Huang P, Xie L, Lin H, Zhou Z, Mo C, Deng G, Yan W, Gao Z, Huang S, Chen Y, Sun X, Lv Z, Gao L. Naringin attenuates alcoholic liver injury by reducing lipid accumulation and oxidative stress. *Life Sci*. 2019: 305 [PMID: 30031061 10.1016/j.lfs.2018.07.031: 10.1016/j.lfs.2018.07.031]



- 30 Jang ZH, Chung HC, Ahn YG, Kwon YK, Kim JS, Ryu JH, Ryu DH, Kim CH, Hwang GS. Metabolic profiling of an alcoholic fatty liver in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Biosyst.* 2012; 2001 [PMID: 22532405 10.1039/c2mb25073j; 10.1039/c2mb25073j]
- 31 Nath B, Levin I, Csak T, Petrasek J, Mueller C, Kodys K, Catalano D, Mandrekar P, Szabo G. Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice. *Hepatology.* 2011; 1526 [PMID: 21520168 10.1002/hep.24256; 10.1002/hep.24256]
- 32 Mandal P, Park PH, McMullen MR, Pratt BT, Nagy LE. The anti-inflammatory effects of adiponectin are mediated via a heme oxygenase-1-dependent pathway in rat Kupffer cells. *Hepatology.* 2010; 1420 [PMID: 20052772 10.1002/hep.23427; 10.1002/hep.23427]
- 33 Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Nath B, Hritz I, Kodys K, Catalano D, Kurt-Jones E, Mandrekar P, Szabo G. Interferon regulatory factor 3 and type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice by way of crosstalk of parenchymal and myeloid cells. *Hepatology.* 2011; 649 [PMID: 21274885 10.1002/hep.24059; 10.1002/hep.24059]
- 34 Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, Barrieau M, Min SY, Kurt-Jones EA, Szabo G. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest.* 2012; 3476 [PMID: 22945633 10.1172/JCI60777; 10.1172/JCI60777]
- 35 Ogryzko NV, Hoggett EE, Solaymani-Kohal S, Tazzyman S, Chico TJ, Renshaw SA, Wilson HL. Zebrafish tissue injury causes upregulation of interleukin-1 and caspase-dependent amplification of the inflammatory response. *Dis Model Mech.* 2014; 259 [PMID: 24203886 10.1242/dmm.013029; 10.1242/dmm.013029]
- 36 McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; G497 [PMID: 15331349 10.1152/ajpgi.00171.2004; 10.1152/ajpgi.00171.2004]
- 37 Schneider AC, Gregório C, Uribe-Cruz C, Guizzo R, Malysz T, Faccioni-Heuser MC, Longo L, da Silveira TR. Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver. *World J Hepatol.* 2017; 418 [PMID: 28357029 10.4254/wjh.v9.i8.418; 10.4254/wjh.v9.i8.418]
- 38 Sepulcre MP, Alcaraz-Pérez F, López-Muñoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML, Mulero V. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J Immunol.* 2009; 1836 [PMID: 19201835 10.4049/jimmunol.0801755; 10.4049/jimmunol.0801755]

- 39 Bala S, Csak T, Saha B, Zatsiorsky J, Kodys K, Catalano D, Satishchandran A, Szabo G. The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J Hepatol*. 2016: 1378 [PMID: 26867493 10.1016/j.jhep.2016.01.035: 10.1016/j.jhep.2016.01.035]
- 40 Dippold RP, Vadigepalli R, Gonye GE, Patra B, Hoek JB. Chronic ethanol feeding alters miRNA expression dynamics during liver regeneration. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013: E59 [PMID: 22823254 10.1111/j.1530-0277.2012.01852.x: 10.1111/j.1530-0277.2012.01852.x]
- 41 Yin H, Hu M, Zhang R, Shen Z, Flatow L, You M. MicroRNA-217 promotes ethanol-induced fat accumulation in hepatocytes by down-regulating SIRT1. *J Biol Chem*. 2012: 9817 [PMID: 22308024 10.1074/jbc.M111.333534: 10.1074/jbc.M111.333534]
- 42 Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell*. 2012: 364 [PMID: 22610888 10.1007/s13238-012-2036-3: 10.1007/s13238-012-2036-3]
- 43 Bala S, Marcos M, Kodys K, Csak T, Catalano D, Mandrekar P, Szabo G. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem*. 2011: 1436 [PMID: 21062749 10.1074/jbc.M110.145870: 10.1074/jbc.M110.145870]

## CONCLUSÕES

- I. No modelo de exposição crônica em zebrafish adulto observamos lesão hepática, deslocamento dos núcleos para a periferia das células no GE em relação ao GC juntamente com o aumento de acúmulo de lipídios hepáticos;
- II. As citocinas *il-1 $\beta$*  e *tnf- $\alpha$*  aumentaram a expressão gênica frente à exposição ao etanol crônico, entretanto *tnf- $\alpha$*  não mostrou diferença significativa e *il-10* não se mostrou alterada entre os grupos.
- III. A expressão de miR-155 e miR-217 circulante aumentou no GE em relação ao GC, entretanto miR-122 não mostrou diferença significativa entre os grupos.
- IV. A expressão hepática de miR-122 e miR-155 se mostraram aumentadas no GE em relação ao GC, porém miR-217 não mostrou diferença significativa entre os grupos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do estudo foi avaliar a expressão de miR-122, miR-155 e miR-217 em um modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto. Até o momento, embora já se tenha estudos com DHA e microRNAs, nenhum estudo utilizou como modelo o zebrafish, no qual foi exposto cronicamente ao etanol, assim demonstrando a originalidade do estudo. A utilização deste modelo traz vantagens, pois não é necessário um agente secundário para causar o dano hepático, o que o torna um excelente modelo animal para estudos de DHA e possíveis terapêuticas para esta patologia.

Os microRNAs são moléculas reguladoras importantes, tanto em animais e plantas e tem como função regular a expressão de genes. Evidências sugerem que os microRNAs estão presentes na fração proteica, bem como nos exossomos o que confere uma alta estabilidade. Isto permite quantificar os microRNAs em tecidos específicos e nos fluidos, tornando-se atraentes como biomarcadores em diversas patologias. Alguns estudos ainda relatam que os microRNAs regulam os processos de proliferação celular e apoptose, que são a chave para a formação do câncer. Embora, os microRNAs se mostram como potenciais ferramentas para o diagnóstico e alvos terapêuticos, ainda a literatura é um pouco contraditória diante de sua expressão na DHA.

Na tabela 1 é apresentado um resumo dos estudos realizados em pacientes e modelos animais de DHA, onde são avaliadas a expressão de miR-122, miR-155 e o miR-217. A busca destes estudos foi realizada utilizando as palavras chaves: “Alcohol”, “Alcoholic liver disease”, “etanol”, “microRNAs”, “miR-122”, “miR-155” e “miR-217” sozinhas e em conjunto. Podemos observar, que para alguns microRNAs a

quantidade de estudos ainda é escassa e sua comparação se torna difícil já que em muitos casos os modelos de estudos assim como o tipo de tecido avaliados diferem entre os trabalhos.

A tabela 1 demonstra que a literatura sobre a expressão de miR-122 e DHA tem resultados contraditórios. Assim por um lado, observamos que 4 estudos incluindo o nosso apresentam um aumento da expressão de miR-122 (Dippold *et al*, 2013, Bala *et al*, 2012 McCrae *et al*, 2016), mas por outra parte Zhang *et al*, e Satishchandran *et al*, mostraram uma diminuição. Já os estudos de miR-155 e miR-217 apresentam menos literatura sobre sua expressão e a DHA, mas os resultados são mais congruentes, inclusive em nosso estudo.

**Tabela 1.** Estudos da expressão de miR-122, miR-155 e miR-217 na DHA

miR	Animal/Humano	Tecido	Tempo de exposição	Expressão	Autor
<b>miR-122</b>	<b>zebrafish</b>	<b>Soro Fígado</b>	<b>28 dias</b>	<b>--</b> <b>↑ miR-122</b>	<b>Presente estudo</b>
miR-122	Ratos	Fígado	35 dias	↑ mir-122	Dippold <i>et al</i> , 2013 <sup>111</sup>
miR-122	Camundongos	Soro	35 dias	↑ mir-122	Bala <i>et al</i> , 2012 <sup>59</sup>
miR-122	Humanos	Soro	Indivíduos antes e após consumo de etanol	↑ miR-122	McCrae <i>et al</i> , 2016 <sup>68</sup>
miR-122	Camundongos	Plasma/fígado	0,5, 1, 2, 3 e 6 h	↑ miR-122	Zhang <i>et al</i> , 2010 <sup>15</sup>
miR-122	Humanos Camundongos	Fígado Fígado	Cirrose/DH A 56 dias	↓ mir-122 ↓ mir-122	Satishchandran <i>et al</i> , 2018 <sup>63</sup>
<b>miR-155</b>	<b>zebrafish</b>	<b>Soro Fígado</b>	<b>28 dias</b>	<b>↑ mir-155</b> <b>↑ mir-155</b>	<b>Presente estudo</b>
miR-155	Camundongos	Células de Kupffer	28 dias	↑ mir-155	Bala <i>et al</i> , 2011 <sup>71</sup>
miR-155	Camundongos	Soro	35 dias	↑ mir-155	Bala <i>et al</i> , 2012 <sup>59</sup>
<b>miR-217</b>	<b>zebrafish</b>	<b>Soro Fígado</b>	<b>28 dias</b>	<b>↑ miR-217</b> <b>--</b>	<b>Presente estudo</b>
miR-217	Camundongos	Fígados e AML-12	30 dias	↑ miR-217	Yin <i>et al</i> , 2012 <sup>12</sup>
miR-217	Camundongos	RAW e células hepáticas	10 dias	↑ miR-217	Yin <i>et al</i> , 2015 <sup>13</sup>

↑: aumento; ↓: diminuição

Ainda existem controvérsias nos estudos de expressão dos microRNAs na DHA, tanto em humanos como em modelos animais, por isso a necessidade de buscar informações destes se torna tão necessária. O entendimento da expressão destes poderá ser um possível marcador do dano hepático causado por etanol e ainda ser utilizado como alvo na terapêutica da doença. Como limitação do estudo, podemos destacar a falta de estudos em zebrafish para podermos comparar na literatura.

Assim, nosso estudo tem como diferencial a utilização do modelo animal zebrafish e sua exposição crônica ao etanol sem nenhum adjuvante, juntamente com a análise da expressão dos microRNAs, o que o torna um estudo inédito.

## **PERPECTIVAS**

Como foi demonstrado neste estudo, os miR-122, miR-155 e miR-217 têm sua expressão alterada frente a exposição crônica ao etanol. No futuro, seria interessante avaliar estes microRNAs em distintos tempos de exposição, para assim verificar se a alteração na sua expressão é anterior aos primeiros sinais de dano hepático, o que possibilitaria sua utilização como marcadores precoces.

Sabemos que a DHA acarreta em aumento da permeabilidade intestinal, assim seria interessante estudar estes parâmetros neste modelo e associar estes resultados com a expressão dos miR-212 e miR-29a, que em alguns estudos associam a expressão de genes relacionados à barreira intestinal.

Outros microRNAs associados com a DHA, como o miR-223 e miR-200a, seriam interessantes alvos de estudos neste modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto.

## REFERÊNCIAS

- 1 WHO. **Global status report on alcohol and health 2018**. Geneva: 478 p. 2018.
- 2 WHO. **Global status report on alcohol and health**. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2014.
- 3 BEIER, J. I.; MCCLAIN, C. J. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. **Biol Chem**, v. 391, n. 11, p. 1249-64, Nov 2010. ISSN 1437-4315.
- 4 NEUMAN, M. G. et al. Alcoholic liver disease: Clinical and translational research. **Exp Mol Pathol**, v. 99, n. 3, p. 596-610, Dec 2015. ISSN 1096-0945.
- 5 BRUHA, R.; DVORAK, K.; PETR TYL, J. Alcoholic liver disease. **World J Hepatol**, v. 4, n. 3, p. 81-90, Mar 2012. ISSN 1948-5182.
- 6 CHEN, Y. P. et al. Circulating MicroRNAs as potential biomarkers for alcoholic steatohepatitis. **Liver Int**, v. 33, n. 8, p. 1257-65, Sep 2013. ISSN 1478-3231.
- 7 XU, T. et al. MicroRNAs in alcoholic liver disease: Recent advances and future applications. **J Cell Physiol**, Aug 2018. ISSN 1097-4652.
- 8 SZABO, G.; BALA, S. MicroRNAs in liver disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 9, p. 542-52, Sep 2013. ISSN 1759-5053.
- 9 WANG, X. W.; HEEGAARD, N. H.; ORUM, H. MicroRNAs in liver disease. **Gastroenterology**, v. 142, n. 7, p. 1431-43, Jun 2012. ISSN 1528-0012.
- 10 BALA, S.; MARCOS, M.; SZABO, G. Emerging role of microRNAs in liver diseases. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 45, p. 5633-40, Dec 2009. ISSN 2219-2840.
- 11 SZABO, G.; SATISHCHANDRAN, A. MicroRNAs in alcoholic liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 35, n. 1, p. 36-42, Feb 2015. ISSN 1098-8971.
- 12 YIN, H. et al. MicroRNA-217 promotes ethanol-induced fat accumulation in hepatocytes by down-regulating SIRT1. **J Biol Chem**, v. 287, n. 13, p. 9817-26, Mar 2012. ISSN 1083-351X.



- 13 YIN, H. et al. miR-217 regulates ethanol-induced hepatic inflammation by disrupting sirtuin 1-lipin-1 signaling. **Am J Pathol**, v. 185, n. 5, p. 1286-96, May 2015. ISSN 1525-2191.
- 14 HU, J. et al. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. **Protein Cell**, v. 3, n. 5, p. 364-71, May 2012. ISSN 1674-8018.
- 15 ZHANG, Y. et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. **Clin Chem**, v. 56, n. 12, p. 1830-8, Dec 2010. ISSN 1530-8561.
- 16 MCGRATH, P.; LI, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 9-10, p. 394-401, May 2008. ISSN 1359-6446.
- 17 PASSERI, M. J. et al. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p. 443-52, Feb 2009. ISSN 1527-3350.
- 18 GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: an important tool for liver disease research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361-77, Nov 2015. ISSN 1528-0012.
- 19 TELI, M. R. et al. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. **Lancet**, v. 346, n. 8981, p. 987-90, Oct 1995. ISSN 0140-6736.
- 20 POOLE, L. G.; DOLIN, C. E.; ARTEEL, G. E. Organ-Organ Crosstalk and Alcoholic Liver Disease. **Biomolecules**, v. 7, n. 3, 08 2017. ISSN 2218-273X.
- 21 FAROOQ, M. O.; BATALLER, R. Pathogenesis and Management of Alcoholic Liver Disease. **Dig Dis**, v. 34, n. 4, p. 347-55, 2016 2016. ISSN 1421-9875.
- 22 CECCARELLI, S.; NOBILI, V.; ALISI, A. Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 44, p. 16443-51, Nov 2014. ISSN 2219-2840.
- 23 O'SHEA, R. S. et al. Alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 307-28, Jan 2010. ISSN 1527-3350.

- 24 SØRENSEN, T. I. et al. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. **Lancet**, v. 2, n. 8397, p. 241-4, Aug 1984. ISSN 0140-6736.
- 25 KAWARATANI, H. et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 495156, 2013. ISSN 1466-1861.
- 26 NATARAJAN, S. K.; PACHUNKA, J. M.; MOTT, J. L. Role of microRNAs in Alcohol-Induced Multi-Organ Injury. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 3309-38, 2015. ISSN 2218-273X
- 27 OSNA, N. A.; DONOHUE, T. M. CYP2E1-catalyzed alcohol metabolism: role of oxidant generation in interferon signaling, antigen presentation and autophagy. **Subcell Biochem**, v. 67, p. 177-97, 2013. ISSN 0306-0225.
- 28 LIEBER, C. S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. **Alcohol**, v. 34, n. 1, p. 9-19, Aug 2004. ISSN 0741-8329.
- 29 SZABO, G.; BALA, S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 11, p. 1321-9, Mar 2010. ISSN 2219-2840.
- 30 SEKI, E.; BRENNER, D. A. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. **Hepatology**, v. 48, n. 1, p. 322-35, Jul 2008. ISSN 1527-3350.
- 31 GAO, B.; BATALLER, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1572-85, Nov 2011. ISSN 1528-0012.
- 32 DUNN, W.; SHAH, V. H. Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. **Clin Liver Dis**, v. 20, n. 3, p. 445-56, Aug 2016. ISSN 1557-8224.
- 33 NAGY, L. E. The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. **Alcohol Res**, v. 37, n. 2, p. 237-50, 2015. ISSN 2168-3492.
- 34 SZABO, G. et al. Gut-liver axis and sensing microbes. **Dig Dis**, v. 28, n. 6, p. 737-44, 2010. ISSN 1421-9875.
- 35 DINARELLO, C. A. Interleukin-1beta and the autoinflammatory diseases. **N Engl J Med**, v. 360, n. 23, p. 2467-70, Jun 2009. ISSN 1533-4406.

- 36 PETRASEK, J. et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 10, p. 3476-89, Oct 2012. ISSN 1558-8238.
- 37 TILG, H. et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 264-74, Jul 1992. ISSN 0016-5085.
- 38 MCCLAIN, C. J. et al. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, n. 3, p. G497-502, Sep 2004. ISSN 0193-1857.
- 39 TSUJIMOTO, T. et al. Augmented hepatocellular carcinoma progression and depressed Kupffer cell activity in rat cirrhotic livers. **Int J Oncol**, v. 18, n. 1, p. 41-7, Jan 2001. ISSN 1019-6439.
- 40 ALDRED, A.; NAGY, L. E. Ethanol dissociates hormone-stimulated cAMP production from inhibition of TNF-alpha production in rat Kupffer cells. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1 Pt 1, p. G98-G106, Jan 1999. ISSN 0002-9513.
- 41 HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 4, p. 271-83, Apr 2005. ISSN 1474-1733.
- 42 MATHURIN, P. et al. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. **Hepatology**, v. 32, n. 5, p. 1008-17, Nov 2000. ISSN 0270-9139.
- 43 LOUIS, H. et al. Modulation of liver injury by interleukin-10. **Acta Gastroenterol Belg**, v. 66, n. 1, p. 7-14, 2003 Jan-Mar 2003. ISSN 1784-3227.
- 44 MILLER, A. M. et al. Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. **Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 846-56, Sep 2011. ISSN 1527-3350.
- 45 LATERZA, O. F. et al. Circulating miR-122 as a potential biomarker of liver disease. **Biomark Med**, v. 7, n. 2, p. 205-10, Apr 2013. ISSN 1752-0371.

- 46 FARAONI, I. et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 6, p. 497-505, Jun 2009. ISSN 0006-3002.
- 47 LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec 1993. ISSN 0092-8674.
- 48 WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855-62, Dec 1993. ISSN 0092-8674.
- 49 GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA Registry. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Database issue, p. D109-11, Jan 2004. ISSN 1362-4962.
- 50 PONTING, C. P.; OLIVER, P. L.; REIK, W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 629-41, Feb 2009. ISSN 1097-4172.
- 51 COSTA, F. F. Non-coding RNAs: Meet thy masters. **Bioessays**, v. 32, n. 7, p. 599-608, Jul 2010. ISSN 1521-1878.
- 52 LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, v. 23, n. 20, p. 4051-60, Oct 2004. ISSN 0261-4189.
- 53 KISS, T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. **Cell**, v. 109, n. 2, p. 145-8, Apr 2002. ISSN 0092-8674.
- 54 WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 228-34, Mar 2009. ISSN 1476-4679. Disponível em: <
- 55 ZENG, Y. Principles of micro-RNA production and maturation. **Oncogene**, v. 25, n. 46, p. 6156-62, Oct 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: <
- 56 SHUKLA, G. C.; SINGH, J.; BARIK, S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. **Mol Cell Pharmacol**, v. 3, n. 3, p. 83-92, 2011. ISSN 1938-1247.
- 57 KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 126-39, Feb 2009. ISSN 1471-0080.

- 58 WEBER, J. A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clin Chem**, v. 56, n. 11, p. 1733-41, Nov 2010. ISSN 1530-8561.
- 59 BALA, S. et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1946-57, Nov 2012. ISSN 1527-3350.
- 60 KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D68-73, Jan 2014. ISSN 1362-4962.
- 61 CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 11, p. 857-66, Nov 2006. ISSN 1474-175X.
- 62 ROTTIERS, V.; NÄÄR, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 239-50, Mar 2012. ISSN 1471-0080.
- 63 SATISHCHANDRAN, A. et al. MicroRNA 122, Regulated by GRLH2, Protects Livers of Mice and Patients From Ethanol-Induced Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 154, n. 1, p. 238-252.e7, 01 2018. ISSN 1528-0012.
- 64 CHANG, J. et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. **RNA Biol**, v. 1, n. 2, p. 106-13, Jul 2004. ISSN 1555-8584.
- 65 WANG, K. et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 11, p. 4402-7, Mar 2009. ISSN 1091-6490.
- 66 TSAI, W. C. et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. **J Clin Invest**, v. 122, n. 8, p. 2884-97, Aug 2012. ISSN 1558-8238.
- 67 ESAU, C. et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. **Cell Metab**, v. 3, n. 2, p. 87-98, Feb 2006. ISSN 1550-4131.
- 68 MCCRAE, J. C. et al. Ethanol consumption produces a small increase in circulating miR-122 in healthy individuals. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 54, n. 1, p. 53-5, 2016. ISSN 1556-9519.

- 69 NAN, Y. M.; WANG, R. Q.; FU, N. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , a potential therapeutic target for alcoholic liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 25, p. 8055-60, Jul 2014. ISSN 2219-2840.
- 70 LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Curr Biol**, v. 12, n. 9, p. 735-9, Apr 2002. ISSN 0960-9822.
- 71 BALA, S. et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. **J Biol Chem**, v. 286, n. 2, p. 1436-44, Jan 2011. ISSN 1083-351X.
- 72 LIPPAI, D. et al. Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70945, 2013. ISSN 1932-6203.
- 73 BALA, S. et al. The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. **J Hepatol**, v. 64, n. 6, p. 1378-87, Jun 2016. ISSN 1600-0641.
- 74 YOU, M. et al. Involvement of mammalian sirtuin 1 in the action of ethanol in the liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 294, n. 4, p. G892-8, Apr 2008. ISSN 0193-1857.
- 75 LIANG, X. et al. Role of SIRT1-FoxO1 signaling in dietary saturated fat-dependent upregulation of liver adiponectin receptor 2 in ethanol-administered mice. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 2, p. 425-35, Jul 2011. ISSN 1557-7716.
- 76 ARVOLA, A.; FORSANDER, O. Comparison between water and alcohol consumption in six animal species in free choice experiments. **Nature**, v. 191, p. 819-20, Aug 1961. ISSN 0028-0836.
- 77 ARTEEL, G. E. Animal models of alcoholic liver disease. **Dig Dis**, v. 28, n. 6, p. 729-36, 2010. ISSN 1421-9875.
- 78 BRANDON-WARNER, E. et al. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. **Alcohol**, v. 46, n. 8, p. 715-25, Dec 2012. ISSN 1873-6823.
- 79 BERTOLA, A. et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). **Nat Protoc**, v. 8, n. 3, p. 627-37, Mar 2013. ISSN 1750-2799.

- 80 HOLMES, R. S. et al. Biochemical and genetic studies on enzymes of alcohol metabolism: the mouse as a model organism for human studies. **Alcohol Alcohol**, v. 21, n. 1, p. 41-56, 1986. ISSN 0735-0414.
- 81 MESTAS, J.; HUGHES, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 2731-8, Mar 2004. ISSN 0022-1767.
- 82 DENOBLE, V. J.; MELE, P. C.; PORTER, J. H. Intravenous self-administration of pentobarbital and ethanol in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 23, n. 5, p. 759-63, Nov 1985. ISSN 0091-3057.
- 83 ZHANG, P. et al. Acute ethanol intoxication inhibits neutrophil beta2-integrin expression in rats during endotoxemia. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 1, p. 135-41, Feb 1998. ISSN 0145-6008.
- 84 SLAWECKI, C. J.; SOMES, C.; EHLERS, C. L. Effects of prolonged ethanol exposure on neurophysiological measures during an associative learning paradigm. **Drug Alcohol Depend**, v. 58, n. 1-2, p. 125-32, Feb 2000. ISSN 0376-8716.
- 85 LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. Study of agents for the prevention of the fatty liver produced by prolonged alcohol intake. **Gastroenterology**, v. 50, n. 3, p. 316-22, Mar 1966. ISSN 0016-5085.
- 86 LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 6, n. 4, p. 523-31, 1982. ISSN 0145-6008.
- 87 LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. **Alcohol Alcohol**, v. 24, n. 3, p. 197-211, 1989. ISSN 0735-0414.
- 88 BEST, C. H.; HARTROFT, W. S. Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by choline. **Br Med J**, v. 2, n. 4635, p. 1002-6, pl, Nov 1949. ISSN 0007-1447..
- 89 COOK, R. T. et al. Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion--absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, n. 10, p. 1746-58, Oct 2007. ISSN 0145-6008.
- 90 LAMAS-PAZ, A. et al. Alcoholic liver disease: Utility of animal models. **World J Gastroenterol**, v. 24, n. 45, p. 5063-5075, Dec 2018. ISSN 2219-2840.

- 91 CHEN, E.; EKKER, S. C. Zebrafish as a genomics research model. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 5, n. 5, p. 409-13, Oct 2004. ISSN 1389-2010.
- 92 ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007. ISSN 1557-8542.
- 93 HE, J. H. et al. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 67, n. 1, p. 25-32, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1873-488X.
- 94 PARNG, C. et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay Drug Dev Technol**, v. 1, n. 1 Pt 1, p. 41-8, Nov 2002. ISSN 1540-658X.
- 95 HINTON, D. E.; COUCH, J. A. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. **EXS**, v. 86, p. 141-64, 1998. ISSN 1023-294X.
- 96 HAMPTON, J. A.; LANTZ, R. C.; HINTON, D. E. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: III. Morphometric analysis of parenchyma, stroma, and component cell types. **Am J Anat**, v. 185, n. 1, p. 58-73, May 1989. ISSN 0002-9106.
- 97 WEIS, P. Hepatic ultrastructure in two species of normal, fasted and gravid teleost fishes. **Am J Anat**, v. 133, n. 3, p. 317-31, Mar 1972. ISSN 0002-9106.
- 98 FARBER, S. A. et al. Genetic analysis of digestive physiology using fluorescent phospholipid reporters. **Science**, v. 292, n. 5520, p. 1385-8, May 2001. ISSN 0036-8075.
- 99 HOWARTH, D. L. et al. Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae. **Zebrafish**, v. 10, n. 2, p. 199-210, Jun 2013. ISSN 1557-8542.
- 100 BRAUNBECK, T. et al. Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to gamma-hexachlorocyclohexane. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 19, n. 3, p. 355-74, Jun 1990. ISSN 0147-6513.
- 101 LIN, T. Y. et al. Hypoxia-inducible factor 2 alpha is essential for hepatic outgrowth and functions via the regulation of leg1 transcription in the zebrafish embryo. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101980, 2014. ISSN 1932-6203.



- 102 TSEDENSODNOM, O. et al. Ethanol metabolism and oxidative stress are required for unfolded protein response activation and steatosis in zebrafish with alcoholic liver disease. **Dis Model Mech**, v. 6, n. 5, p. 1213-26, Sep 2013. ISSN 1754-8411.
- 103 HOWARTH, D. L.; PASSERI, M.; SADLER, K. C. Drinks like a fish: using zebrafish to understand alcoholic liver disease. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 5, p. 826-9, May 2011. ISSN 1530-0277.
- 104 LAALE, H. W. Ethanol induced notochord and spinal cord duplications in the embryo of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **J Exp Zool**, v. 177, n. 1, p. 51-64, May 1971. ISSN 0022-104X.
- 105 JANG, Z. H. et al. Metabolic profiling of an alcoholic fatty liver in zebrafish (*Danio rerio*). **Mol Biosyst**, v. 8, n. 7, p. 2001-9, Jul 2012. ISSN 1742-2051.
- 106 LIN, J. N. et al. Development of an Animal Model for Alcoholic Liver Disease in Zebrafish. **Zebrafish**, v. 12, n. 4, p. 271-80, Aug 2015. ISSN 1557-8542.
- 107 SCHNEIDER, A. C. et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 371-8, Aug 2014. ISSN 1557-8542.
- 108 SCHNEIDER, A. C. et al.. Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver. **World J Hepatol**, v. 9, n. 8, p. 418-426, Mar 2017. ISSN 1948-5182.
- 109 SCHNEIDER, A. C. et al.. *Lactobacillus rhamnosus* GG Effect on Behavior of Zebrafish During Chronic Ethanol Exposure. **Biores Open Access**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2016. ISSN 2164-7844.
- 110 GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, n. 4, p. 752-61, Dec 2006. ISSN 0091-3057.
- 111 DIPPOLD, R. P. et al. Chronic ethanol feeding alters miRNA expression dynamics during liver regeneration. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 37 Suppl 1, p. E59-69, Jan 2013. ISSN 1530-0277.

## APÊNDICE

### Resumos e Apresentações produzidos durante o mestrado:

#### Resumo 1

“Gene expression of miR-122, miR-217 and miR-155 in alcoholic liver disease in zebrafish”

Amanda Pasqualotto<sup>1</sup>, Larisse Longo<sup>1</sup>, Raquel Ayres, Carolina Uribe Cruz<sup>1</sup>, Themis Reverbel da Silveira<sup>2</sup>, Mário R. Álvares-da-Silva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

<sup>3</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Abstract Number: ALD-147

Poster Presentation Reference: P04-4

Dear Mrs PASQUALOTTO,

On behalf of the Scientific Programme Committee, we are very pleased to inform you that your abstract entitled “**Gene expression of miR-122, miR-217 and miR 155 in alcoholic liver disease in zebrafish**” has been accepted for an **electronic poster (ePoster) presentation** at the EASL-AASLD joint meeting “Definition, therapeutic advances and clinical endpoints in alcoholic liver disease and alcoholic hepatitis” to be held in London, United Kingdom from 30 September to 1 October 2017.

## **Apresentação Oral 1**

“Exposição crônica ao etanol e sua relação com a expressão gênica de interleucinas inflamatórias em mir-122, mir-155 e mir-217 em zebrafish (*Danio rerio*)”

Prezado(a), Amanda Pasqualotto

O IV Fórum de Jovens Pesquisadores da SBH recebeu uma quantidade expressiva de trabalhos, que foram submetidos a cuidadoso critério de seleção. Todos os trabalhos foram avaliados, sem qualquer identificação dos autores, por três examinadores independentes e a seleção dos trabalhos foi baseada exclusivamente na média final obtida.

É com grande satisfação que comunicamos que seu trabalho, intitulado "**Exposição crônica ao etanol e sua relação com a expressão gênica de interleucinas inflamatórias e mir-122, mir-155, mir-217 em zebrafish (*Danio rerio*)**" foi selecionado para apresentação no Fórum, que será realizado no Renaissance São Paulo Hotel, no dia 16 de agosto de 2018.

Durante as apresentações os trabalhos serão avaliados por uma comissão julgadora, que selecionará os melhores trabalhos para obtenção de menção honrosa da SBH.

## **Co-autoria de trabalhos realizados durante o mestrado:**

Artigo 1- status: em revisão (Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology)

“Hepatoprotective effect of probiotic *Lactobacillus rhamnusius* GG through the modulation of gut permeability and inflammasomes in model of alcoholic liver disease in zebrafish”

Juliana Paula Bruch-Bertani<sup>1,2</sup>; Amanda Pasqualotto<sup>1,2</sup>; Larisse Longo<sup>1,2</sup>; Raquel Ayres<sup>1</sup>; Carolina B Beskow<sup>1,2</sup>; Afonso Barth<sup>3</sup>; Daiana Lima-Morales<sup>3</sup>; Fábio Meurer<sup>5</sup>; Gabriel Guerreiro<sup>1,2</sup>; Themis da Silveira<sup>1,2</sup>; Mário R Álvares-da-Silva<sup>1,2,6</sup>; Carolina Uribe-Cruz<sup>1,2</sup>; Valesca Dall’Alba<sup>1,2,7</sup>

1. Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

2. Post Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

3. Research Laboratory on Bacterial Resistance (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

5. Post Graduate Program in Sustainable Development of Aquaculture, Universidade Federal do Paraná, Campus de Palotina, Paraná, Brazil

6. Department of Internal Medicine. School of Medicine, UFRGS. Gastroenterology and Hepatology Division, HCPA, Porto Alegre, Brazil

7. Department of Nutrition. School of Medicine, UFRGS. Nutrition Division. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS. Porto Alegre, Brazil.

Artigo 2 – status: em revisão (Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology)

“Intestinal tight junctions assay in early stages of alcoholic and non-alcoholic hepatic steatosis in zebrafish”

MSc Carolina Bortolin Beskow<sup>1,2</sup>, Amanda Pasqualotto<sup>1,2</sup>, PhD Carolina Uribe-Cruz<sup>1,2</sup>, PhD Larisse Longo<sup>1,2</sup>, MSc Raquel Ayres<sup>1,2</sup>, PhD Themis Reverbel da Silveira<sup>2,4</sup>, PhD Mário Reis Alvares-da-Silva<sup>1,2,3</sup>, PhD Valesca Dall’Alba<sup>1,2,5</sup>

1. Postgraduate Program in Gastroenterology and Hepatology Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

2. Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

3. Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

4. Postgraduate Program in Pediatrics: Health Care of Children and Adolescents, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

5. Department of Nutrition, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS.