



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde - FS
Laboratório de Farmacologia Molecular

Ana Carolina Yamamoto Silva

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Efeito da depleção da microbiota intestinal sobre a resposta do tecido adiposo à sinalização beta-3 adrenérgica

Orientadora: Angélica Amorim Amato

Co-orientadora: Doutoranda Bruna Teles Soares Beserra

Brasília

2017

ANA CAROLINA YAMAMOTO SILVA

**Efeito da depleção da microbiota intestinal sobre a resposta do tecido adiposo à
sinalização beta-3 adrenérgica**

Trabalho de conclusão de curso de graduação

Em Farmácia, da Universidade de Brasília, como

Requisito parcial para obtenção do Grau em bacharel em

Farmácia.

Orientadora: Angélica Amorim Amato

Co-orientadora: Doutoranda Bruna Teles Soares Beserra

Brasília

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO DA DEPLEÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A RESPOSTA DO TECIDO ADIPOSEO À SINALIZAÇÃO BETA-3-ADRENÉRGICO

Ana Carolina Yamamoto Silva

Trabalho de conclusão apresentado ao curso de graduação em Farmácia da
Universidade de Brasília

Aprovado em ____ de _____ de 2017.

Banca examinadora

Profa. Angélica Amorim Amato – Universidade de Brasília

Profa. Mariella Guimarães Lacerda– Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Tomoe Fátima Yamamoto Silva e João Roberto da Silva, por abraçarem junto a mim meus objetivos e dificuldades, tornando possível, real minha jornada na graduação em Farmácia da Universidade de Brasília. Ao meu irmão Paulo Eduardo, meu sobrinho Pedro, as minhas avós Claide Maria Galbero da Silva e Shigueko Yamamoto, meus falecidos avôs João da Silva e Taketoci Yamamoto, mas presentes em meus pensamentos. Aos meus tios, primos e amigos residentes do Distrito federal, do meu querido estado de São Paulo, de minha querida cidade Jaboticabal-SP e da receptiva cidade Paracatu-MG, por serem fonte de inspiração, exemplo de caráter, força, determinação, sucesso e leveza, mas principalmente por me acolherem em todos os momentos, de felicidade, tensão, tristeza, decisão e da difícil saudade de quem mora longe.

Agradeço a minha professora orientadora, Angélica Amorim Amato e minha Co-orientadora Bruna Teles Soares Beserra, primeiramente pela oportunidade, paciência, aprendizado, me apresentando uma área profissional que desconhecia, tornando meus conhecimentos e a graduação mais completos. Mas acima de tudo pelo aprendizado da humildade, integridade, humanidade, sabedoria, dedicação e amizade, também características de um profissional exemplar, as quais me fizeram persistir nesse caminho.

Agradeço a minhas colegas de trabalho, Carol, Fernanda, Janice e Alana pelo apoio, ajuda e parceria durante o projeto de pesquisa.

Agradeço a todos meus professores, colegas de curso e funcionários da Universidade de Brasília, que de alguma maneira acrescentaram em minha vida acadêmica e pessoal.

E por fim, mas não menos importante, apenas por ser a explicação de todo acontecimento e concretização de mais uma etapa, meu muito obrigada ao nosso esplendoroso Deus.

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde pertinente na população brasileira atual, a qual acarreta outros problemas de saúde, como hipertensão, diabetes *mellitus* tipo 2, problemas cardiovasculares e alguns tipos de câncer. A obesidade corresponde ao excesso de gordura corporal, processo que é influenciado por fatores como a composição da microbiota intestinal (determinada também pela dieta que o ser humano e outros mamíferos apresentam) e a expressão e atividade da proteína UCP-1 (Unconpling Protein 1), a qual se encontra nas mitocôndrias presentes nos tecidos adiposos branco e marrom, proteína responsável por desencadear a cascata da termogênese, quando estimulada por fatores térmicos, químicos gerados por metabólitos originados do processamento da dieta pela microbiota intestinal. Dieta, que por sua vez, influencia a composição da microbiota intestinal. Assim o experimento tendo como objetivo a análise da expressão da UCP-1. A qual foi realizada pelo método de PCR quantitativa em tempo real, a partir da comparação entre quatro grupos experimentais de camundongos machos da linhagem C57BL/6, livres de patógenos, onde o grupo um foi o controle, recebeu apenas dieta normolipídica e água potável filtrada como veículo, o grupo dois recebeu dieta normolipídica, água potável filtrada e administração do agonista beta-3-adrenérgico, o grupo três recebeu dieta normolipídica, água potável filtrada com antibióticos, e o grupo quatro recebeu dieta normolipídica, água potável filtrada com antibióticos e administração do agonista beta-3-adrenérgico. Ao analisar os resultados foi possível observar o aumento da expressão da UCP-1 no tecido adiposo branco epididimal e inguinal, referente ao grupo dois, três e quatro. Mas não havendo contraste, diferença significativa, no tecido adiposo marrom.

Palavras-chave: microbiota intestinal, termogênese, UCP-1, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, tecido adiposo bege e obesidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	7
1.1 MICROBIOTA INTESTINAL	7
1.2 TECIDO ADIPOSEO	9
1.3 OBESIDADE	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MÉTODOS	15
3.1 MODELO ANIMAL	15
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	15
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	16
3.4 EXPRESSÃO GÊNICA	17
3.4.1 ISOLAMENTO DO RNA TOTAL	17
3.4.2 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL	18
3.4.3 TRATAMENTO DO RNA	19
3.4.4 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	19
3.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS	22
4.1 EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A EXPRESSÃO DO TRANSCRITO DA UCP-1 NOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E MARROM	22
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS	28
ANEXO A – DECLARAÇÃO DA CEUA	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROBIOTA INTESTINAL

O termo “microbiota intestinal” refere-se aos micro-organismos que residem no intestino, sendo composta por espécies nativas que colonizam permanentemente o trato gastrointestinal e por número variável de micro-organismos que o habitam temporariamente. A microbiota intestinal humana compreende 10 a 100 trilhões de micro-organismos, pertencentes principalmente aos gêneros bacterianos *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* e cocos gram-positivos. Além disso, compreende 3,3 milhões de genes, o que corresponde a 150 vezes o número de genes do genoma humano (QIN et al, 2010).

A concentração de bactérias é aumentada cerca de oito vezes a partir de regiões proximais do intestino delgado (10^3 bactérias/g) até o cólon. No estômago e duodeno, o número de micro-organismos é reduzido devido aos ácidos, bile e secreções pancreáticas; com o avanço para o intestino delgado, a acidez diminui em função da diluição do ácido, o que facilita a colonização bacteriana, atingindo 10^{11} UFC (unidades formadoras de colônias)/mL no cólon (DUEÑAS et al, 2015).

A microbiota intestinal tem muitas funções importantes no intestino humano, tais como metabolismo de nutrientes (fermentação dos carboidratos, supressão da inibição da lipoproteína lipase em adipócitos, metabolismo de proteínas, síntese de vitamina K e de componentes das vitaminas do complexo B e degradação dos polifenóis), metabolismo de xenobióticos e drogas, proteção antimicrobiana, imunomodulação, como também manutenção da estrutura e função do trato gastrointestinal (JANDHYALA et al, 2015).

A composição da microbiota intestinal varia de indivíduo para indivíduo, a depender do estilo de vida de uma pessoa, região geográfica onde o indivíduo vive (zona rural ou urbana, mundo ocidental ou oriental), os alimentos consumidos, uso de medicamentos, cultura e genética (DAO, M.C et al CLÉMENT, K, 2017). Estes mesmos fatores também podem levar à disbiose, caracterizada por desequilíbrio na microbiota intestinal, fator que gera complicações fisiológicas, endócrinas e metabólicas, e está relacionada ao desenvolvimento da obesidade (GUIDA, S. et al VENEMA, K., 2015). A obesidade, por sua vez, é uma doença não transmissível, caracterizada pelo acúmulo de

gordura, na forma de triglicerídeo, nas células do tecido adiposo, os adipócitos (OMS, 2015).

A ligação da microbiota intestinal com doenças endócrinas e metabólicas não tem seus mecanismos completamente estabelecidos, mas parece decorrer, entre outros aspectos, de produtos liberados pelas bactérias intestinais, como metabólitos resultantes da fermentação pelas bactérias. Estes podem alterar quimicamente o ambiente do trato gastrointestinal e também se translocar para outros tecidos, como o tecido adiposo (DAO, M.C et al CLÉMENT, K, 2017).

Em humanos e também em modelos animais é observada a associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes tipo 2, obesidade, e outras doenças metabólicas, onde quando há a ingestão de dieta hiperlipídica há também o aumento de metabólitos como os polissacarídeos e carboidratos, os quais ativarão vias metabólicas, vias inflamatórias, quando se ligam em receptores específicos no fígado, tecido adiposo e sistema nervoso central, gerando um acúmulo de triglicerídeos nos tecidos adiposos e interferência na liberação de hormônios, como a insulina (VIJAY-KUMAR M., et al., 2010), sugerindo o envolvimento da microbiota intestinal na regulação do metabolismo energético (DELZENNE, N. M. et al BURCELIN, R., 2008). Estudos envolvendo camundongos isentos de germes (*germ-free*) indicam que estes animais, quando alimentados com dieta normolipídica, apresentaram peso corporal 40% mais baixo do que animais colonizados por bactérias. Os camundongos isentos de germes são, também, protegidos contra o ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica, diferentemente de animais colonizados. Além disso, em animais colonizados e alimentados com dieta hiperlipídica, a erradicação da microbiota intestinal com a administração de antibiótico diminui as alterações metabólicas por, entre outros aspectos, diminuir a liberação de endotoxinas (DELZENNE, N. M. et al BURCELIN, R., 2008).

Um papel importante da microbiota intestinal, envolvido em seu efeito de regular o peso corporal, e o aumento na taxa de extração de energia não digerível, glicemia e insulina, provenientes do aumento da glicose no intestino, produto da digestão enzimática microbiana de polissacarídeos. Esses dois fatores, insulina e glicemia, estimulam a atividade enzimática como acetyl-CoA carboxylase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS), promotoras da lipogênese hepática que resulta em triglicerídeos, controladas pela proteína sensível a carboidratos ChREBP-1 e pelo fator de transcrição SREBP-1, conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1

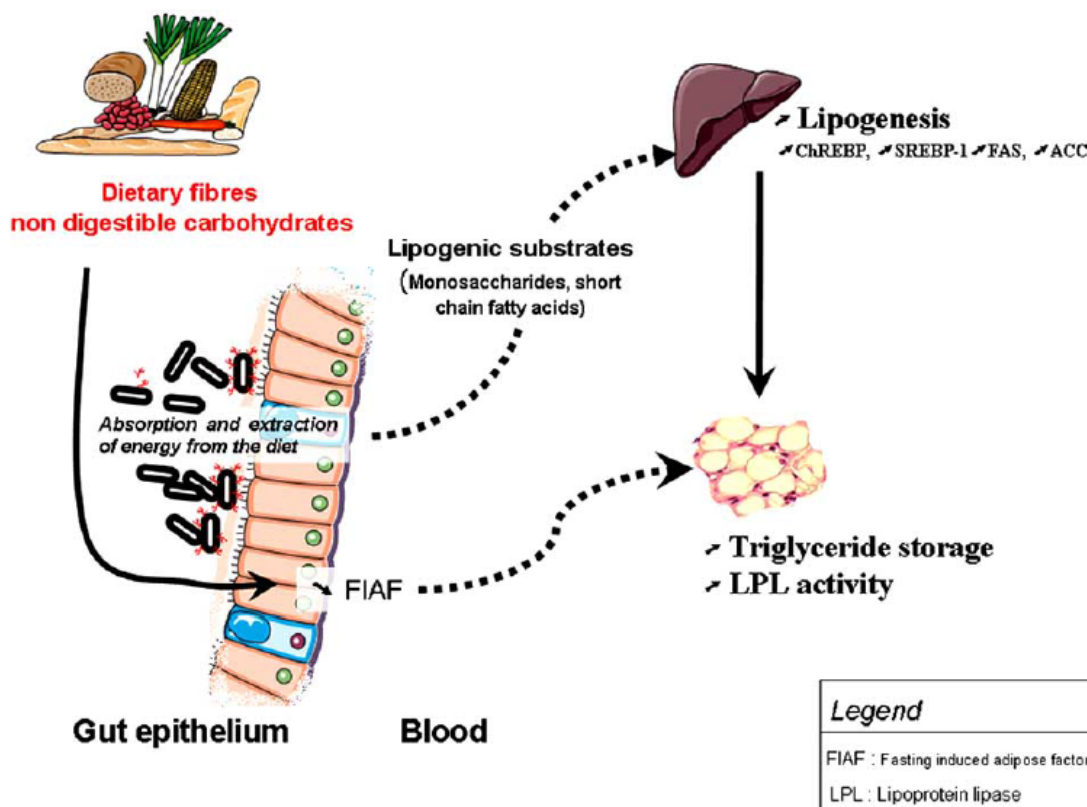


Figura 1 – Ilustração da absorção de polissacarídeos

Após a ingestão da dieta rica em fibras e carboidratos, ocorre a formação de metabólitos como lipopolissacarídeos, glicose, ácidos graxos de cadeia curta, monossacarídeos e energia. Os substratos lipogênicos, monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta, ultrapassarão o epitélio intestinal para a circulação sanguínea, em direção ao fígado, e os polissacarídeos ultrapassarão o epitélio intestinal, após a indução da FIAF (fator de indução ao tecido adiposo), para a circulação sanguínea em direção ao tecido adiposo, onde ativa-se a enzima lipase de lipoproteína, que realizará hidrólise dos triglicérides em lipoproteínas, para seu armazenamento. No fígado ocorrerá o estímulo da proteína sensível a carboidratos ChREBP-1 e do fator de transcrição SREBP-1, consequentemente das enzimas acetyl-CoA carboxylase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS), promovendo a lipogênese, a qual resulta em triglicérides que irão ser armazenados nos adipócitos (CANI, P.D.; DELZENNE, N.M.,2009).

1.2 TECIDO ADIPOSE

O tecido adiposo é um subtipo de tecido conjuntivo, onde encontra-se uma grande quantidade de células agrupadas ou isoladas, denominadas de adipócitos. É encontrado por todo o corpo e, em pessoas com peso corporal normal, representa de 20-25% do peso

corporal das mulheres e de 15-20% dos homens. Com a função de armazenamento energético na forma de triglicerídeos, modelador da superfície do corpo humano, por se encontrar embaixo da pele, absorventes de choques, isolantes térmicos, preenche espaços entre os órgãos e excretam diversas moléculas sintetizadas por ele. É classificado em dois tipos: tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM) (JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J., 2012).

O TAB, também conhecido como tecido adiposo unilocular, representa a maior porcentagem do tecido adiposo no corpo humano. As células adiposas uniloculares são grandes, medem 50-150 μm de diâmetro quando completamente desenvolvidas, e apresentam apenas uma gotícula de gordura, a qual ocupa quase todo o citoplasma (JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J., 2012). Também apresenta uma pequena quantidade de mitocôndrias e núcleo perifericamente localizado (SAMMONS, 2014).

O TAM, também conhecido como tecido adiposo multilocular, é distribuído em áreas específicas, como cervical, supraclavicular, intra-abdominal, abdominal e pélvica. No corpo humano adulto, encontra-se em quantidade reduzida, quando comparado com o feto e recém-nascido. Suas características histológicas se diferem das apresentadas no tecido adiposo branco, sendo suas células com tamanhos menores, presença de várias gotículas lipídicas de diversos tamanhos e de mitocôndrias. Esse tecido tem a função de produzir calor, por meio da termogênese, que depende da lipólise e oxidação de ácidos graxos (JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J., 2012).

Na termogênese do TAM, um dos protagonistas é a proteína UCP-1 (Uncoupling Protein 1), exclusivamente presente na mitocôndria nesse tipo de célula, ativada por fatores como ingestão de alimentos, frio, estresse, compostos naturais e drogas. Quando ativada, desacopla a fosforilação oxidativa do ATP, gerando calor, transformando a reserva energética, de triglicerídeos, em calor (LIDELL, M. E.; BETZ, M. J., et al ENERBEACK, S, 2014)

Além desses dois adipócitos citados anteriormente, há um terceiro adipócito, o adipócito bege, que apresenta características semelhantes ao TAM, como a quantidade de mitocôndria aumentada, gotículas de lipídeos multiloculares e expressão da UCP-1, e que aparece no TAB em resposta ao frio ou à estimulação β 3-adrenérgica. Este tipo celular tem o mesmo precursor embrionário do adipócito branco, caracterizados por não expressarem o fator de transcrição miogênico 5 (Myf5). A diferenças citadas entre os

tecidos adiposos branco, marrom e bege, podem ser observadas microscopicamente na figura 2 (HARMS; SEALE, 2013; KEIPERT; JASTROCH, 2013).

Figura 2

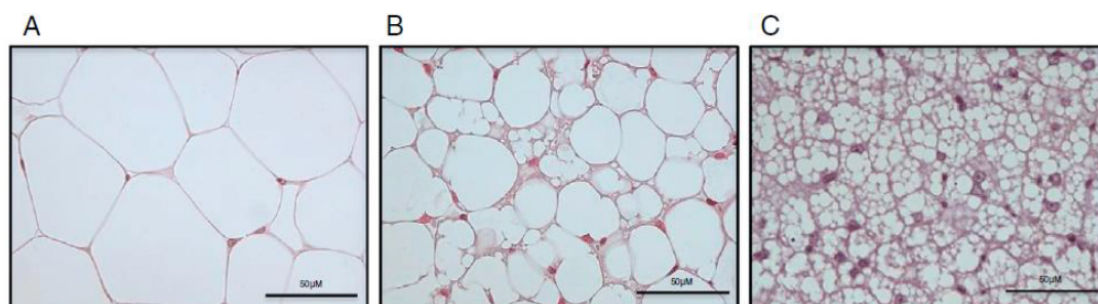


Figura 2 – Tipos de tecido adiposos

Figura A representa a morfologia do tecido adiposo branco; Figura B representa a morfologia do tecido adiposo marro; Figura C representa o tecido adiposo bege (KEIPERT; JASTROCH, 2014).

É oportuno mencionar que o aumento da quantidade e/ou atividade do tecido adiposo termogênico TAM ou TAB amarronzado (adipócitos bege) pode levar ao aumento do gasto energético, que pode ser favorável na prevenção da obesidade. O aumento da quantidade de tecido adiposo termogênico também pode ter efeito benéfico sobre o metabolismo da glicose e lipídeos independente do efeito sobre o peso corporal (KIM; PLUTZKY, 2016).

1.3 OBESIDADE

Obesidade é uma doença crônica, caracterizada por distúrbios metabólicos, com o acúmulo excessivo de gordura e risco de doenças como diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão e alguns tipos de câncer (GUIDA, S. et al VENEMA, K., 2015). É possível identificar o excesso de peso (sobrepeso ou obesidade) pelo cálculo de índice de massa corporal (IMC), ou peso em kg, dividido pela altura em m². É considerado excesso de peso quando o IMC apresenta-se igual ou maior que 25 kg/m² e obesidade quando o IMC apresenta-se igual ou maior que 30 kg/m², de acordo com a tabela 1 (VIGITEL,2016).

Tabela 1 – Classificação de sobrepeso e obesidade

IMC (KG/M²)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/CLASSE	RISCO DE DOENÇA
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5-24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25-29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade	I	Elevado
35-39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

(OMS, 2016)

Sua etiologia é proveniente principalmente do estilo de vida a que o ser humano se submete, onde é levado em consideração diminuição da atividade física e alimentação com alto índice calórico. Mas também de fatores genéticos, classe social, uma realidade onde leva-se em consideração o nível de informação e educação presente no cidadão, estresse, ansiedade, depressão, nervosismo, medicamentos, como insulina, glicocorticoides, antidepressivos e antipsicóticos. Fatores que são ambientais, emocionais, genéticos e estilo de vida (Sociedade Brasileira para Estudos da Obesidade e da Síndrome metabólica, 2009).

O excesso de peso vem tornando-se uma característica comum no mundo de hoje, quando as pessoas estão iniciando a ter consciência da gravidade, mas ainda pode-se ver que houve crescimento de 26,3% em dez anos da obesidade, passando de 42,6% em 2006 para 53,8% em 2016, com prevalência nos homens, na população brasileira. Dentre as cidades brasileiras, Rio Branco –AC tem a maior prevalência de excesso de peso, e Palmas – TO, a menor. Sobre a obesidade pode-se dividir em dois grupos: por idade, onde há sua prevalência duplicada a partir dos 25 anos; e pela escolaridade, onde apresenta-se maior entre as pessoas com menor escolaridade. Dentre os fatores que levam à obesidade e ao excesso de peso, houve o consumo de frutas e hortaliças ser de apenas um entre três adultos em cada cinco dias da semana, em relação ao consumo regular de refrigerante ou suco artificial, houve o decaimento de 30,9% para 16,5%, de 2007 para 2016. Na atividade física no tempo livre obteve acréscimo de 30,3% para 37,6%, de 2009 para 2016, e entre os jovens de 18 a 24 anos, o consumo abusivo de bebida alcoólica obteve acréscimo de 15,7% para 19,1%. Contudo, o histórico e cenário brasileiro exigem pesquisas voltadas para saúde da população, buscando explicações e intervenções que

possam auxiliar a qualidade de vida e saúde de pessoas com excesso de peso e obesidade. Dados os quais mostram que a obesidade está diretamente ligada com o tipo de alimentação de cada indivíduo, a qual interfere diretamente na composição da microbiota intestinal levando a pessoa obter mais ou menos peso (VIGITEL,2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da modulação da microbiota intestinal, com antibióticos sobre a resposta do tecido adiposo à sinalização beta-3 adrenérgica, em camundongos C57BL/6.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o efeito da modulação da microbiota intestinal, em camundongos alimentados com dieta normolipídica, em condições basais de temperatura e hidratação hídrica, e em resposta ao tratamento com agonista beta-3-adrenérgico, sobre a expressão da proteína UCP-1, nos tecidos adiposos:

- Tecido adiposo branco inguinal
- Tecido adiposo branco epididimal
- Tecido adiposo marro intraescapular

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MODELO ANIMAL

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, livres de patógenos específicos, cuja microbiota intestinal é apenas constituída por micro-organismos não patogênicos. Os camundongos foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), mediante apresentação de laudo técnico de sua qualidade sanitária (análise bacteriológica, bioquímica, hematológica e parasitológica) e controle genético (teste de genotipagem).

Ao chegarem ao Biotério da Universidade de Brasília (UnB), em sua quarta semana de vida, os animais permaneceram em gaiolas de plástico, isoladoras da marca Alesco[®]. Foram divididos em grupos de cinco camundongos por gaiola. O ambiente era mantido com a temperatura de 25°C, com ciclo claro e escuro (18h00 e 6h00) a cada 12 horas. Os animais passaram por um período de adaptação de uma semana ao novo ambiente, antes do início do experimento.

Todos os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelas Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB-DoC número 148177/2014), o qual se encontra em anexo.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os camundongos foram alimentados com dieta normolipídica, em que 10% do conteúdo calórico da dieta era representado por lipídios, fornecida na forma de *pellet*, obtida da empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências[®], paralelamente com água potável filtrada fornecida *ad libitum*.

Os camundongos foram separados aleatoriamente em sua quinta semana de vida, por sorteio, e divididos em quatro grupos. Cada grupo continha cinco animais e sua designação ocorreu da seguinte maneira:

Grupo 1 – Grupo controle, animais receberam apenas dieta normolipídica e água potável filtrada.

Grupo 2 – Grupo controle positivo, esses camundongos receberam dieta normolipídica, água potável filtrada e o agonista beta-3-adrenérgico. Este grupo permitiu evidenciar o efeito do agonista beta-3-adrenergético sobre os desfechos do estudo.

Grupo 3 – Camundongos receberam dieta normolipídica, e solução de antibióticos administrados para modulação da microbiota intestinal. Este grupo permitiu evidenciar o efeito da modulação da microbiota intestinal sobre os desfechos do estudo.

Grupo 4 – Camundongos receberam dieta normolipídica, agonista beta-3-adrenérgico e solução de antibióticos. Evidenciaram o efeito do agonista beta-3-agonista, diante do cenário de modulação da microbiota intestinal.

O agonista beta-3-adrenérgico utilizado foi o CL316,243 (Sigma-Aldrich®), na dose de 1mg/kg/dia, diluído em cloreto de sódio a 0,9% e administrado por via intraperitoneal, durante cinco dias, durante a décima quarta e décima quinta semanas de vida dos camundongos. Este esquema de administração foi realizado com base em dados de estudo prévio (SANCHES, 2012). Os grupos um e três receberam cloreto de sódio a 0,9% por via parenteral, durante o mesmo período do grupo dois, como controle.

Para a modulação da microbiota intestinal, com a intenção de aliminar a microbiota intestinal, foram oferecidos os antibióticos vancomicina (0,5 g/L) e ciprofloxacina (0,2 g/L), os quais encontravam-se diluídos na água potável oferecida, por cinco semanas, da décima à décima quinta semanas de vida, de acordo com esquema descrito em estudo prévio (SUEZ et al., 2014). Ressaltando que foi utilizado 280 µL/L de ácido acético glacial para a diluição do ciprofloxacina e adicionado 3,75 mg/mL de aspartame para que a solução fosse mais palatável para os camundongos. A troca dos bebedouros com a solução de antibióticos era realizada duas vezes por semana (NAHOUM et al., 2004).

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Foram avaliados e mensurados o peso corporal, ingestão da dieta e ingestão hídrica. Três vezes por semana, no período matutino, da quinta à décima semanas de vida dos camundongos, enquanto estavam sendo administrado os antibióticos, essas variáveis

foram analisadas duas vezes por semana, no momento da troca dos bebedouros com antibióticos.

Após o término do tratamento, ao final do estudo, os camundongos foram eutanasiados, conforme as diretrizes do CONCEA (diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA) (CONCEA, 2013) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Guia brasileiro para boas práticas para eutanásia em animais) (CFMV, 2013). Ao término da eutanásia, a carcaça dos animais foi descartada segundo as normas para este tipo de procedimento (Lei Nacional de Resíduos Sólidos Nº 12.305/2010).

Houve a coleta o tecido adiposo branco visceral do epidídimo e subcutâneo inguinal, e o tecido adiposo marrom interescapular, para realizar o PCR em tempo real para determinação da expressão do transcrito da UCP-1.

3.4 EXPRESSÃO GÊNICA

A análise da expressão do gene que codifica a proteína termogênica UCP-1 foi realizada no tecido adiposo branco subcutâneo e visceral e no tecido adiposo marrom, como citado anteriormente.

3.4.1 ISOLAMENTO DO RNA TOTAL

Após a coleta do tecido adiposo branco subcutâneo inguinal e epididimal, e do tecido marrom interescapular, estes foram congelados para evitar sua degradação e, consequentemente, do RNA total. As amostras foram subsequentemente descongeladas e homogeneizadas imediatamente em tubos cônicos de 15 mL com o Trizol (Invitroogen, Life Technologies), na porção de 0,1 g de tecido por mL de Trizol, utilizando-se um homogeneizador de tecidos. Após essa etapa as amostras de tecidos foram incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos e, em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm, por dez minutos, a 4°C. Houve então a formação do *pellet* de *debris* celulares e de uma camada de gordura, não muito espessa, a qual foi descartada e a amostra centrifugada novamente.

Após a segunda centrifugação, foi coletado o sobrenadante, que foi transferido para um microtubo de 1,5mL, portanto o pellet descartado. Aos microtubos foram adicionados 200µL de clorofórmio por mL de Trizol, já utilizado no processo de homogeneização. Os tubos foram agitados em vórtex por quinze segundos, incubados a temperatura ambiente por três minutos e centrifugados a 14.000 rpm, durante quinze minutos, a 4°C. Após a centrifugação houve a formação de três fases: fase com a coloração avermelhada, que se refere à fase inferior com a presença do DNA; a fase com a coloração branca, que se refere à fase intermediária com presença de proteína, e a fase incolor, que se refere à fase superior com a presença do RNA, o qual é o material de interesse. A fase aquosa, superior, onde está presente o material de interesse, o RNA, foi transferida para um microtubo de 1,5mL, juntamente adicionados 500µL de isopropanol absoluto, por mL de Trizol já adicionado na etapa de homogeneização. Para uma melhor mistura do material, os tubos foram agitados em vórtex, permaneceram durante dez minutos a temperatura ambiente, em seguida centrifugados a 14.000 rpm, durante dez minutos, a 4°C, momento em que ocorre a formação do *pellet* de RNA. O fato de o RNA ser o material de interesse fez com que o sobrenadante fosse descartado, e os tubos foram posicionados com sua parte superior, onde há abertura para inserção dos materiais, virada para baixo, sobre uma gaze estéril, para a secagem do *pellet*. Após sua secagem, o *pellet* foi ressuspensionado em volumes de 20 a 50µL de água MilliQ tratada com dietilpirocarbonato a 80°C até sua utilização.

3.4.2 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

A quantificação do RNA total foi determinada a partir de sua concentração, pelo equipamento eletrônico de espectrofotometria de microvolume NanoDrop 2.000/2.000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmingtons, Delaware, USA). O NanoDrop fornece automaticamente a concentração total do RNA em µg/µL, a qual é determinada pelo cálculo: $(DO_{260nm} \times 40) / 100$. A DO 260 representa o valor da densidade óptica da alíquota de amostra determinada no comprimento de onda 260nm.

O NanoDrop também fornece automaticamente o grau de pureza, o qual é calculado pela razão entre as densidades ópticas nos comprimentos de onda entre 260 e

280nm. A pureza denota baixo conteúdo de proteínas e outras impurezas na amostra e fica evidenciada pela razão entre 1,7 e 2,0.

3.4.3 TRATAMENTO DO RNA

O RNA total presente nas amostras foi tratado com a enzima desoxirribonuclease (DNase) (Sigma-Sldrich, St Louis, MO, EUA), a qual tem a função de catalisar a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiésteres, durante dez minutos, a temperatura ambiente, de acordo com o protocolo do fabricante. Dessa forma, evita-se a possível contaminação da amostra com DNA genômico, o qual pode interferir na análise da expressão gênica.

3.4.4 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Para esse procedimento foi utilizado o kit Power SYBR[®] Green RNA-to-CT 1-Step (applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com que a transcrição reversa (RT) e a amplificação do cDNA a partir do RNA total extraído das amostras de tecido adiposo branco e marrom é realizada sequencialmente. O sistema de avaliação da expressão gênica utiliza o fluoróforo SYBR[®], o qual se intercala na dupla fita de DNA, emitindo fluorescência quando exposto a um comprimento de onda que o excita, e fluorescência emitida é proporcional à quantidade do produto de amplificação. Com isso, avalia-se o Ct (ciclo limiar, *cycle threshold*), que representa o ciclo em que a reação de amplificação começa a ocorrer exponencialmente.

As reações de PCR quantitativa em tempo real foram preparadas em placas contendo 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems), e conduzidas em triplicatas, com volume final de 10 µL. Foi realizado também controle negativo, o qual não continha amostra de RNA. Foram, ainda, usados os primers específicos utilizados para amplificação da UCP-1, *forward* 5'-ACTGCCACACCTCCAGTCATT-3', e *reverso* 5'-CTTTGCCTCACTCAGGATTGG-3'. O gene referência foi o que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), onde foram utilizados os primers

forward 5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3' e *reverso* 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'.

As reações foram realizadas com o uso do termociclador AB7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com as seguintes condições:

- Programa de transcrição reversa: 48°C
- Ativação da Taq DNA polimerase, a 95°C, durante 10 minutos
- Quarenta ciclos de desnaturação, a 95°C durante 10 minutos e anelamento e amplificação (60°C durante 1 minuto).
- Após cada reação, foram realizadas curvas de dissociação, para averiguar a especificidade da reação. Para essa análise houve o aumento gradativo da temperatura, com acréscimo de 0,3°C, elevando de 60°C para 95°C. Conforme há o aumento da temperatura, a fluorescência decai. Conforme há o decaimento acelerado da fluorescência emitida, é determinado o ponto mais crítico denominado de temperatura de dissociação T_m (melting temperatura), o qual determina o momento em que o produto de PCR se apresenta 50% em fita dupla e 50% em fita simples. Cada fita de DNA amplificada apresenta seu T_m , por isso é esperado a identificação de apenas um pico de decaimento para cada par de *primers* utilizado.

Para determinar a expressão relativa do gene alvo, foi realizado por método comparativo $\Delta\Delta C_t$, incluindo a normalização do gene referência, o qual codifica a GAPDH. Havendo a subtração de C_t obtidos de cada amostra das reações de amplificação do gene alvo, do C_t das mesmas amostras das reações de amplificação do gene referência, resultando no ΔC_t .

$$\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ gene referência}$$

Segundo o método realizado para determinar a expressão relativa do gene alvo, é determinado pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Graph Pad Prism 5.0 foi o programa utilizado para analisar os dados obtidos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Também foi utilizada a análise de variância de um fator (one way ANOVA) com o pós-teste Newman-Keuls, para comparar os grupos durante o período de tratamento. E a análise do RNAm foi realizada pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste Dunn, e nível de significância foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Durante o período da pesquisa, não houve perda de animais, de forma que o número amostral analisado foi o indicado na seção “material e métodos”.

Os camundongos que foram tratados com o agonista $\beta 3$ adrenérgico, apresentaram redução significativa da massa do tecido adiposo visceral epididimal e inguinal em relação ao grupo que recebeu veículo. Além disso, foi observada redução também significativa da massa destes tecidos no grupo tratado com antibióticos e agonista $\beta 3$ adrenérgico, em relação ao grupo tratado somente com antibióticos. Em relação ao tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal), somente foi observada mudança significativa no grupo de camundongos que recebeu antibiótico e agonista $\beta 3$ adrenérgico em relação ao grupo que recebeu veículo. Como também, foi observado, redução da massa do tecido adiposo marrom interescapular no grupo de camundongos que recebeu antibióticos e o agonista beta 3 adrenérgico, em comparação com o grupo que recebeu somente antibióticos.

4.1 EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A EXPRESSÃO DO TRANSCRITO DA UCP-1 NOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E MARROM

Foi observado aumento da expressão relativa do RNAm da UCP-1 nos dois tecidos, tecido adiposo branco inguinal e tecido adiposo branco epididimal, em resposta a todos os tratamentos. No tecido adiposo branco inguinal (Figura 3) e no tecido adiposo branco epididimal (Figura 4), o aumento foi menos acentuado em resposta à modulação da microbiota com antibióticos, mais acentuado em resposta ao tratamento com o agonista beta-3-adrenérgico e pareceu haver efeito aditivo da modulação da microbiota intestinal com antibióticos e tratamento com agonista beta-3-adrenérgico.

Figura 3

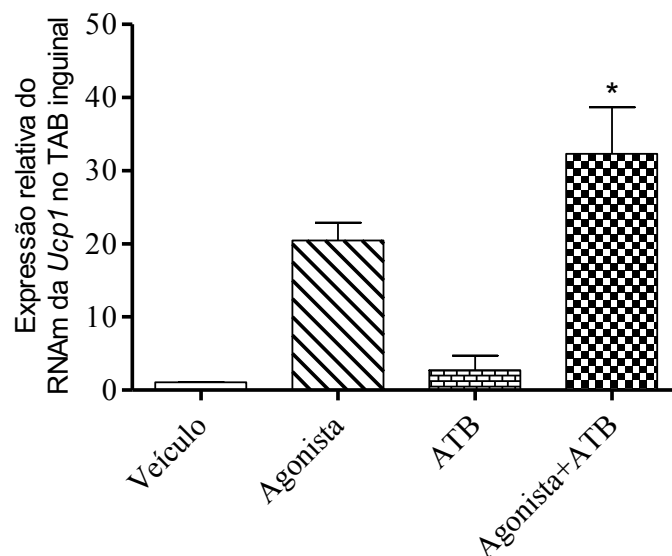


Figura 3 - Expressão relativa do RNAm da UCP-1 no TAB inguinal

Nesse gráfico pode-se observar a expressão significativa da UCP-1 no tecido adiposo branco inguinal no grupo experimental no qual foi administrado o agonista beta-3-adrenérgico juntamente com o antibiótico. Quando comparada com os grupos que receberam apenas o agonista beta – 3 adrenérgico, apenas o antibiótico e o grupo controle.

Figura 4

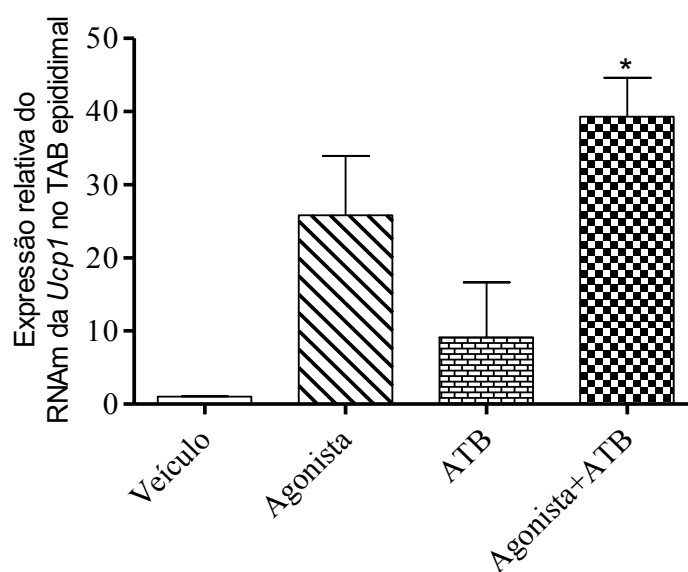


Figura 4 – Expressão relativa do RNAm da UCP-1 no TAB epididimal

Nesse gráfico observa-se a expressão significativa da UCP-1 no tecido adiposo branco do grupo no grupo experimental no qual foi administrado o agonista beta-3-adrenérgico juntamente com o antibiótico. Quando comparada com os grupos que receberam apenas o agonista beta – 3 adrenérgico, apenas o antibiótico e o grupo controle.

No tecido adiposo marrom, não foi observada mudança significativa da expressão do RNAm da UCP-1 (Figura 5).

Figura 5

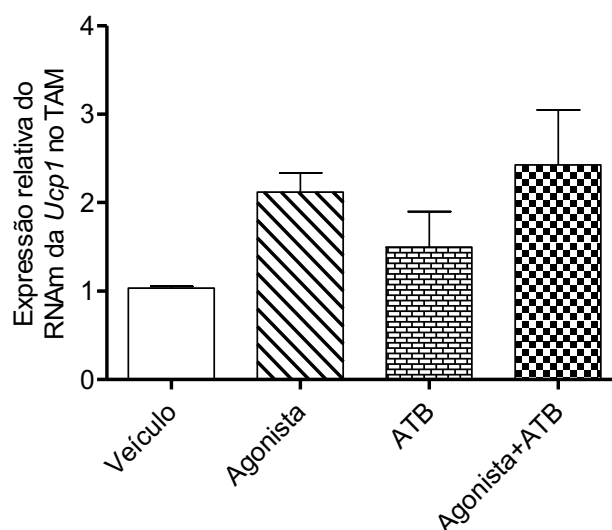


Figura 5 - Expressão relativa do RNAm da UCP-1 no TAM

Nesse gráfico observa-se que não houve diferença de expressão significativa entre os grupos experimentais tratados com apenas agonista beta-3-adrenérgico, apenas com o antibiótico, quando comparados com o grupo experimental o qual foi administrado o agonista beta – 3 – adrenérgico juntamente com o antibiótico.

5 DISCUSSÃO

Neste experimento realizado com animais tratados por dieta normolipídica, em condições basais e livres de patógenos, os quais representaram mamíferos com hábitos de uma dieta equilibrada em lipídios. Sendo esse um dos elementos causadores da obesidade, a qual é ocasionada pelo acúmulo do excesso de gordura no tecido adiposo, quando os lipídios e carboidratos são consumidos desreguladamente, em excesso. Pelas condições impostas, o método utilizado possibilitou observar se realmente há interferência da microbiota intestinal sobre a resposta no tecido adiposo branco e marrom.

Quando o grupo dois (camundongos com administração do agonista beta-3-adrenérgico), três (camundongos com erradicação da microbiota intestinal ocasionada pela ingestão de antibióticos) e quatro (camundongos com administração do agonista beta-3-adrenérgico e erradicação da microbiota intestinal), foram comparados com o grupo um, controle, observou-se a comprovação da interferência da microbiota intestinal sobre o tecido adiposo.

Interferência analisada pela expressão da UCP-1, através de PCR em tempo real, onde observou-se que os camundongos tratados com antibióticos e agonista beta-3-adrenérgico apresentaram maior expressão da UCP-1 no tecido adiposo branco inguinal e epididimal. Enquanto que nenhuma diferença significativa, foi observada no tecido adiposo marrom. Fato que pode ser explicado com a maior quantidade de mitocôndrias presentes no tecido adiposo marrom, onde naturalmente já há um maior gasto de energia, não sendo somatizada significativamente a ação do agonista com a expressão da UCP-1 nesse tecido. Considerando a hipótese de que a maior quantidade de gordura consumida pelos mamíferos, se armazenam no tecido adiposo branco.

Dois estudos recentemente publicados mostraram que a microbiota intestinal pode estar relacionada com o tecido adiposo termogênico, sugerindo outro aspecto fisiológico do hospedeiro passível de influência pela microbiota intestinal. No estudo realizado por Suárez-Zamorano et al (2015), demonstrou que a ausência da microbiota intestinal, em camundongos isentos de germes e em camundongos alimentados com dieta normolipídica e tratados com antibióticos, aumentou a sensibilidade a insulina no tecido adiposo subcutâneo e visceral. A análise morfológica do tecido adiposo revelou aumento do

número de adipócitos pequenos com fenótipo multilocular de aparência escura com características de adipócito bege. Além disso, esse fenótipo foi ser transferido para camundongos isentos de germes, a partir de sua colonização com a microbiota residual de camundongos tratados com antibióticos, sugerindo que algumas bactérias da microbiota intestinal podem inibir o recrutamento de células beges.

No estudo de Chevalier et al (2015), foi observado que a exposição de camundongos ao frio promoveu mudanças da composição da microbiota intestinal. Os pesquisadores também observaram que o transplante da microbiota intestinal de animais expostos ao frio para animais isentos de germes resultou em aumento da sensibilidade à insulina, redução da gordura corporal, aumento do gasto energético e amarronzamento do TAB subcutâneo e visceral, em relação aos camundongos isentos de germes que receberam a microbiota de animais mantidos em ambiente termoneutro. Os autores observaram, ainda, que a exposição ao frio e o transplante da microbiota de animais expostos ao frio para camundongos isentos de germes promoveram aumento da superfície de absorção intestinal. Estes resultados sugerem fortemente o impacto positivo da microbiota intestinal sobre a homeostase energética e o amarronzamento do TAB em resposta ao frio. Os resultados deste estudo parecem contraditórios com os de Suárez-Zamorano et al (2015), descrito acima, em que foi observado impacto negativo da microbiota intestinal sobre o amarronzamento do TAB e que a ausência da microbiota não modifica o amarronzamento do TAB de camundongos ao frio. Desta forma, a correlação entre a microbiota intestinal e o amarronzamento do TAB parece não estar completamente definida.

6 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo sugerem que, em animais alimentados com dieta normolipídica, a modulação da microbiota intestinal com o uso de antibióticos acentua o efeito estimulatório da sinalização beta-3 adrenérgica sobre a expressão de UCP-1 no tecido adiposo branco inguinal e epididimal, porém nenhum efeito significativo foi observado no tecido adiposo marrom.

7 REFERÊNCIAS

ABESO - Sociedade Brasileira para Estudos da Obesidade e da Síndrome metabólica, 2009.

CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, n.13, p.1546-1558, 2009.

CHEVALIER, C. et al. Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. **Cell Press**, v.163, p.1360-1374, 2015.

CONCEA - CNdCdEA. Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. In: **Ministério da Ciência e Tecnologia**, editor. 2013.

DAO, M.C et al CLÉMENT, K. Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. **Institute of cardiometabolism and nutrition**. Paris, França, 2017.

DELZENNE, N. M. et al BURCELIN, R. Changes in gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. **Diabetes**. V. 57, 2008.

DUEÑAS, M. et al. Studies on Modulation of Gut Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches. **Antioxidants**, v.4, p.1-21, 2015.

GUIDA, S. et al VENEMA, K. Gut microbiota and obesity: Involvement of the adipose tissue. **School for nutritional and Translational Research in metabolism** - Campus Venlo, P.O. 2015.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential, **Nature Medicine**, v.19, n.10, 2013.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, n.29, p.8787-8803, 2015.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KEIPERT, S.; JASTROCH. Brite/beige fat and UCP1 is it thermogenesis ? **Biochimia et Biophysica Acta**, v.1837, n.7, p.1075-1082, 2014.

KIM, S. H.; PLUTZKY, J. Brown fat and browning for the treatment of obesity and related metabolic disorders, **Diabetes Metab**, v.40, p.12-21, 2016.

LIDELL, M. E.; BETZ, M. J., et al ENERBEACK, S. Brown adipose tissue and its therapeutic potential. **Journal of international medicine**. V 276, P. 364-377, 2014.

NAHOUM, S.R. et al Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. **Cell**, v.118, p.229-241, 2004.

OMS – Organização Mundial da Saúde, 2015.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, p. 59–65, 2010.

SAMMONS; M.F; PRICE; D.A. Modulation of adipose tissue thermogenesis as a method for increasing energy expenditure. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.24, p.425-429, 2014.




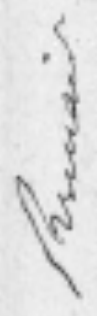
SANCHEZ, J. et al. PTEN Loss in the Myf5 Lineage Redistributes Body Fat and Reveals Subsets of White Adipocytes that Arise from Myf5 Precursors. **Cell Metabolism**, v.16, p.348-362, 2012.

SUÁREZ-ZAMORANO, N. et al. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. **Nature Medicine**, v. 21, p.1497–1501, 2015.

VIGITEL. VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. **Excesso de peso e obesidade**. Brasília, 2016.

VIJAY-KUMAR M., et al. Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5, **Science**, v. 328, p. 228-231, 2010

ANEXO A – DECLARAÇÃO DA CEUA

 Universidade de Brasília <small>Instituto de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso Animal</small>	<p>Brasília, 11 de novembro de 2014.</p> <p></p> <p style="text-align: center;">DECLARAÇÃO</p> <p>Declaramos que o projeto intitulado "EFEITO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE O RECRUTAMENTO DO ADIPÓCITO BEGE EM CAMUNDONGOS", UnBDoC n.º 148177/2014, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de <u>MUS MUSCULUS</u>: 25. A presente aprovação é válida pelo período de 01/02/2015 a 01/12/2015.</p> <p></p> <p style="text-align: right;"> Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior Coordenador da CEUA</p> <p><small>* Este documento de avaliação ética de projeto supracitado e não substitui outros laudos e permissões que possam ser feitas necessárias.</small></p>
---	---