



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA-FCE
CURSO DE FARMÁCIA**

Carine Sampaio Cerqueira Sodré

Análise da ativa o de macrófagos por tecidos adiposos brancos e marrons e o papel dos micro-RNAs neste processo

Brasília
2018

Carine Sampaio Cerqueira Sodré

Análise da ativação de macrófagos por tecidos adiposos brancos e marrons e o papel dos micro-RNAs neste processo

Monografia de conclusão de curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Coorientadora: Profa. Dra. Camila Alves Arede

Brasília
2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sa Sampaio Cerqueira Sodre, Carine
Análise da ativação de macrófagos por tecidos adiposos
brancos e marrons e o papel dos micro-RNAs neste processo
/ Carine Sampaio Cerqueira Sodre; orientador Kelly Grace
Magalhães; co-orientador Camila Alves Areda. -- Brasília,
2018.
31 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. tecido adiposo. 2. micro-RNAs. 3. macrófagos. I.
Magalhães, Kelly Grace, orient. II. Alves Areda, Camila, co
orient. III. Título.

Carine Sampaio Cerqueira Sodré

Análise da ativação de macrófagos por tecidos adiposos brancos e marrons e o papel dos micro-RNAs neste processo.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Kelly Grace Magalhães
Departamento de Biologia Celular - Universidade de Brasília
Orientadora

Prof.^a Dr.^a. Camila Alves Arede
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília
Coorientadora

Prof. Dr.^a. Lívia Pimentel de Sant'Ana Dourado
Centro Universitário Euroamericano

Msc. Dalila Juliana Silva Ribeiro
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar pelos melhores caminhos, por sua proteção e por ser sempre presente na minha vida.

Agradeço à Professora Kelly pela oportunidade, e por ter generosamente confiado a mim esse projeto. Obrigada pelos ensinamentos, pelas reuniões enriquecedoras, pela paciência e por sempre nos incentivar a sermos melhores e a ir além.

Agradeço à Professora Camila, que esteve sempre presente em vários momentos da minha graduação, por todo incentivo, disponibilidade e parcerias nessa trajetória.

Aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida, obrigada por me darem não só raízes e asas, mas princípios e apoio sempre. Amo-os!

Aos queridos amigos Andrea e Ailton, obrigada por me acolherem tão bem em Brasília, tornando tudo isso possível e a Mônica e Gilberto por todo suporte sempre que precisei, vocês foram a minha família brasileira.

Ao Professor Luis, gratidão por ter guiado meu aprendizado no mundo nano e por todas as oportunidades. Em especial, agradeço a Rayane que me adotou como estagiária, e me ensinou tanto e de maneira tão didática.

Ao Luís, colaborador desse projeto, que sempre se preocupou em me ajudar mesmo com uma agenda cheia de compromissos, obrigada por orientar meus experimentos, pela atenção e por sempre tirar minhas dúvidas. Tenho certeza que será um excelente profissional.

A Lívia e a Dalila, por todas as sugestões e disponibilidade em fazer parte dessa banca, ao Rafa por todos os auxílios, por ser sempre atencioso e prestativo, e aos demais amigos do LIM1: Ana, Carla, Débora, Gabi, Gabriel, Helô, Igor, Isa, Júnior, Luana, Milena, Nath, Pasqua, Sabrina e Wembley, por me receberem tão bem, por todas as contribuições e momentos de descontração.

RESUMO

SODRÉ, C. S. C. **Análise da ativação de macrófagos por tecidos adiposos brancos e marrons e o papel dos micro-RNAs neste processo.** 2018. 31f. Monografia. Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

O tecido adiposo é caracterizado por ser um tecido dinâmico, composto não apenas por adipócitos, mas também por diversas células imunológicas, fibroblastos, células endoteliais, matriz extracelular e alta vascularização. Devido a grande diferença de função e morfologia, os tecidos adiposos podem ser divididos em quatro tipos: tecido adiposo branco (WAT), tecido adiposo marrom (BAT), tecido adiposo bege e tecido adiposo rosa. O presente trabalho será focado no estudo de WAT e BAT. Em WAT, os adipócitos apresentam uma única gotícula de gordura, com o núcleo deslocado para a periferia do citoplasma, pequena quantidade de mitocôndrias, sendo atribuído a eles um importante papel de armazenamento energético, além de possuir uma grande capacidade de mediar a inflamação pela produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias. Do outro lado, temos os adipócitos do BAT, no qual são encontradas pequenas gotículas de gordura, núcleo mais desenvolvido e grande número de mitocôndrias, sendo a ele atribuído principalmente a capacidade termogênica. O tecido adiposo é reconhecido atualmente como um órgão endócrino devido a sua capacidade de secretar citocinas, ácidos graxos, hormônios e micro-RNAs. Os micro-RNAs presentes nesse tecido, por sua vez, são liberados via exossomos e são capazes de atuar como sinalizadores endócrinos, de forma parácrina e/ou endócrina e modular o metabolismo e a inflamação. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a modulação da ativação de macrófagos pelos produtos de secreção de WAT e BAT, através da verificação da presença de corpúsculos lipídicos nessas células, e analisar o papel dos micro-RNAs destes tecidos neste processo. Para isso foi utilizado camundongos C57BL/6 com deleção da enzima Dicer (responsável pela produção de micro-RNAs) especificamente no tecidos adiposos (*Adicer* KO) através do sistema de deleção *CreLox*, bem como camundongos selvagens (*lox*). Sendo assim, estimulamos a cultura celular de macrófagos com o produto da secreção dos tecidos adiposos brancos e marrons desses animais. Após as análises, foi verificado que, os tecidos adiposos brancos e marrons possuem um papel diferencial na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos, sendo que o produtos de secreção de WAT induziram uma maior ativação de macrófagos, através da indução da biogênese de corpúsculos lipídicos nestas células, quando comparado ao BAT. Além disso, macrófagos estimulados com os produtos de secreção de animais *Adicer* KO (tanto de WAT quanto de BAT) apresentaram maior biogênese de corpúsculos lipídicos quando comparados aos animais selvagens. Em suma, dessa forma foi possível concluir que produtos da secreção dos tecidos adiposos brancos induzem maior ativação de macrófagos do que tecidos adiposos marrons, e que os micro-RNAs de ambos os tecidos adiposos desempenham um papel importante no controle dessa ativação de macrófagos e no estado inflamatório desse tecido.

Palavras-chave: Tecido adiposo. micro-RNAs. Macrófagos. Corpúsculos lipídicos.

ABSTRACT

SODRÉ, C. S. C. **Analysis of the macrophage activation by brown and white adipose tissues and the role of micro-RNAs in this process.** 2018. 31f. Monograph. Faculty of Ceilândia – University of Brasilia, Brasília, 2018.

Adipose tissue is characterized by being a dynamic tissue composed not only of adipocytes but also of several immune cells, fibroblasts, endothelial cells, extracellular matrix, and high vascularization. Due to the great difference in function and morphology, adipose tissue can be divided into four types: white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), beige adipose tissue and pink adipose tissue. The present work will focus on the study of WAT and BAT. In WAT, adipocytes present a single fat droplet, with the nucleus displaced to the periphery of the cytoplasm, small number of mitochondria, being attributed to them an important role of energy storage, besides having a great capacity to mediate the inflammation by the production of proinflammatory cytokines and adipokines. On the other side, we have the BAT adipocytes, in which small droplets of fat, a more developed nucleus, and a large number of mitochondria are found, mainly attributed to thermogenic capacity. Adipose tissue is currently recognized as an endocrine organ because of its ability to secrete cytokines, fatty acids, hormones, and micro-RNAs. The micro-RNAs present in this tissue, in turn, is released via exosomes and are capable of acting as endocrine, paracrine and/or endocrine signals and modulate metabolism and inflammation. Thus, the objective of this work was to analyze the modulation of macrophage activation by the WAT and BAT secretion products, by verifying the presence of lipid bodies in these cells, and to analyze the role of the micro-RNAs of these tissues in this process. For this, C57BL / 6 mice with Dicer enzyme (responsible for the production of micro-RNAs) were specifically used in adipose tissue (Adicer KO) through the CreLox deletion system, as well as wild mice (lox). Thus, we stimulate macrophage cell culture with the secretion product of the white and brown adipose tissues of these animals. After the analysis, it was verified that the white and brown adipose tissues have a differential role in the induction of lipid droplets biogenesis, and the WAT secretion products induced a greater activation of macrophages through the induction of lipid droplets biogenesis in these compared to BAT. In addition, macrophages stimulated with the products of secretion of Adicer KO animals (both WAT and BAT) presented higher biogenesis of lipid droplets when compared to wild animals. In summary, it was possible to conclude that white adipose tissue secretion products induce a greater activation of macrophages than brown adipose tissues and that micro-RNAs from both adipose tissues play an important role in the control of macrophages activation and in the inflammatory state of this tissue.

Keywords: Adipose tissue. micro-RNAs. Macrophages. Lipid Droplets

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	O Tecido adiposo.....	9
1.2	micro-RNAs.....	12
1.3	Macrófagos do tecido adiposo e corpúsculos lipídicos.....	15
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo Geral	18
3.2	Objetivo Específico	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Animais.....	19
4.2	Macrófagos derivados da medula óssea	19
4.3	Extração de tecidos adiposos brancos e marrons.....	20
4.4	Co-cultivo de macrófagos com o sobrenadante da cultura dos tecidos adiposos.....	21
4.5	Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo	21
4.6	Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos por <i>Oil Red</i>	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
	ANEXOS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Tecido adiposo

O tecido adiposo é caracterizado por ser um tecido dinâmico, composto não apenas por adipócitos, mas também por diversas células imunológicas, fibroblastos, células endoteliais, matriz extracelular e alta vascularização (FRANCISQUETI *et al.*, 2015).

O caráter dinâmico desse tecido decorre da sua constante renovação celular e também da sua capacidade de interagir ativamente com outras células e sistemas do organismo. Essa interação e comunicação é mediada por adipocinas, que são proteínas solúveis liberadas por esse tecido e que afetam vários processos biológicos do organismo como por exemplo, a inflamação, homeostase, e pode ainda acarretar numa maior susceptibilidade a doenças crônicas como diabetes tipo 2, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (KOSTELI *et al.*, 2010).

Devido à variedade de adipocinas existentes, essas podem ser classificadas em: citocinas (por exemplo, fator de necrose tumoral- $TNF\alpha$, Interleucinas 6 e 8); quimiocina (por exemplo, a MCP-1, proteína quimiotática de monócitos-1) e proteínas que atuam como hormônios ou biomarcadores de doenças metabólicas como resistência insulínica (leptina, adiponectina e resistina) (PINTO, 2014). Há ainda os ácidos graxos livres e recentemente, descobriu-se que micro-RNAs também são secretados por esse tecido (ARNER, 2015).

Dessa forma, devido a essa diversidade de substâncias produzidas e secretadas pelo tecido adiposo e da capacidade dessas em atuar de maneira autócrina, parácrina e endócrina, esse tecido passou a ser considerado um órgão endócrino. Sendo assim, essas adipocinas são capazes de atuar de maneira local ou sistêmica, modulando a resposta inflamatória e processos metabólicos (SCHAFFLER *et al.*, 2006).

Existem quatro tipos de tecidos adiposos. Sendo eles: o tecido adiposo branco (WAT, do inglês, *white adipose tissue*), tecido adiposo marrom (BAT, do inglês, *brown adipose tissue*), tecido adiposo bege e mais recentemente descobriu-se o tecido adiposo rosa. Esses tecidos apresentam características distintas quanto a sua composição, morfologia e função (Figura 1).



Figura 1. Estrutura do adipócito dos tecidos marrom, bege e branco. Adaptado de (TRAN, MUKHERJEE et al., 2016)

O WAT está localizado em humanos principalmente nas regiões subcutâneas abdominal, glúteo e femoral, e em modelo murino nas regiões, supragenadal e mesentérica. Os adipócitos presentes nesse tecido são considerados uniloculares, pois observa-se uma única gota de gordura preenchendo grande área dessa célula e que acarreta no deslocamento do núcleo celular para a periferia do citoplasma, existe uma escassez de organelas e menor número de mitocôndrias quando comparado aos adipócitos do BAT. Além de adipócitos, esse tecido é constituído por células do estroma vascular, por exemplo, fibroblastos, pré-adipócitos e células imunológicas sendo elas: macrófagos, linfócitos T CD4 e CD8, células *natural killer*, mastócitos e eosinófilos (BRESTOFF, 2015).

Essas células contribuem para a homeostase de glicose e modulam o estado inflamatório desse tecido, contribuindo para manutenção de um microambiente mais pró-inflamatório. Um exemplo dessa modulação ocorre na obesidade, por exemplo, no tecido adiposo de obesos novos adipócitos estão constantemente sendo formados, através do processos de hiperplasia (aumento do número de adipócitos), e hipertrofia (aumento do volume dos adipócitos), esse crescimento, no entanto, acarreta na redução do fluxo sanguíneo local, gerando condições de hipóxia em várias áreas, o que leva a morte de adipócitos. Adipócitos senescentes ou em processo de morte, por sua vez, liberam mediadores inflamatórios, que induzem principalmente, o recrutamento e infiltração de macrófagos nesse tecido, fazendo desse um tecido mais inflamado.

Além de influenciar na inflamação, esse tecido apresenta como principal função descrita o armazenamento de energia, podendo participar participa da regulação do balanço energético através do processo de lipólise e lipogênese (ZHANG *et al.*, 2018).

O BAT, por sua vez, encontra-se nas regiões suprarrenal, supraclavicular, e cervical em humanos, já em roedores está presente na região interescapular. O adipócito é multilocular, sendo possível perceber o citoplasma repleto de gotículas de gordura e um maior número de mitocôndrias o que torna sua coloração mais escura e contribui para sua função termogênica, ou seja, liberar energia na forma de calor e regulando dessa forma a temperatura corporal. Tal função, decorre da fosforilação da proteína desacopladora UCP-1 presente na grande quantidade de mitocôndrias desses adipócitos, liberando calor (ZHANG *et al.*, 2018).

BAT e WAT são os dois tipos mais estudados até o momento e sua distribuição corpórea varia com a idade (BAT diminui à medida que envelhecemos), fatores ambientais (animais expostos ao frio possuem mais BAT), uso de betabloqueadores adrenérgicos, exercício físico (induzem transdiferenciação do tecido para BAT), alimentação (camundongos magros têm mais BAT do que os obesos) e também varia conforme o sexo (fêmeas apresentam mais BAT do que machos) (GIORDANO *et al.*, 2016; BARBATELLI *et al.*, 2010).

No entanto, existem também áreas na qual adipócitos do WAT e do BAT se misturam, na qual chamamos de tecido adiposo bege (VITALI *et al.*, 2012). Nessas regiões adipócitos de ambos os tecidos desempenham suas funções em conjunto, sendo capazes de se converterem para WAT, processo denominado *whitening* (branqueamento), em situações de balanço energético positivo, ou seja, o organismo não necessita liberar calor, ou podem se converter para BAT, processo conhecido como *browning* (amarronzamento), em situações de exposição crônica ao frio, por exemplo. Esse tecido bege apresenta um padrão intermediário do WAT e do BAT, dessa forma carrega características de ambos e seus adipócitos são denominados pauciloculares (CINTI, 2018).

Além do bege, um quarto tipo de tecido adiposo também vem sendo estudado, o tecido adiposo rosa, presente nas glândulas mamárias de gestantes e lactantes. Foi observado em modelo animal que os adipócitos presentes nas glândulas mamárias se convertem em células produtoras de leite (alvéolos) durante a gestação e no período pós lactação as células do epitélio alveolar retornam a sua morfologia anterior, convertendo-se em adipócitos (MORRONI *et al.*, 2004). Logo, essa diferenciação é transitória, os adipócitos rosas retornam ao seu padrão anterior ao final da lactação (Figura 2).

Assim, fica evidente, portanto, quão dinâmico o tecido adiposo é, sua capacidade de interagir com todo o organismo e também de se remodelar em resposta a estímulos (CINTI, 2018).

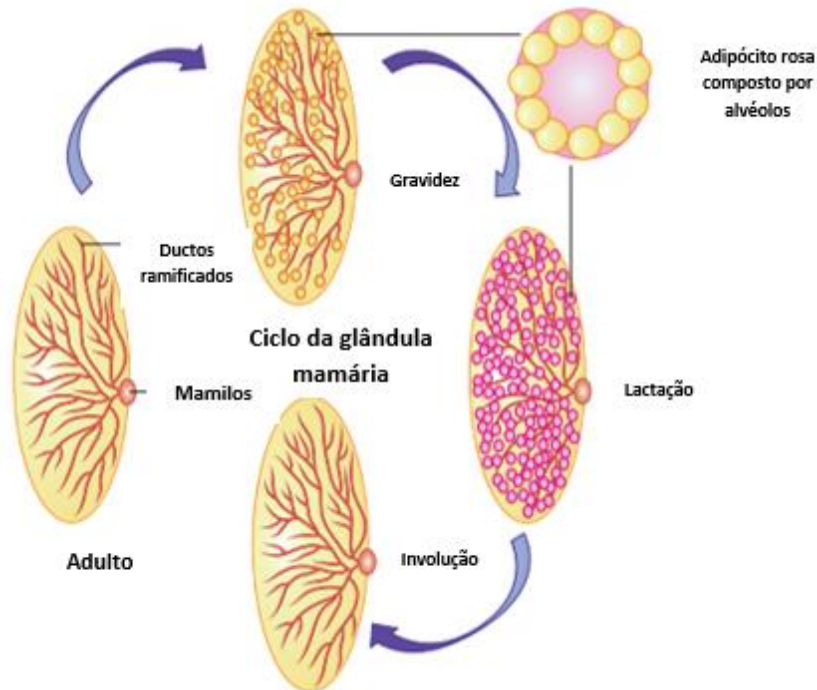


Figura 2. Glândula mamária na fase adulta, gravidez, lactação e pós-lactação. Adaptado de (CINTI, 2018).

1.2 micro-RNAs

Micro-RNAs são RNAs pequenos, fita simples, possuindo cerca de 22 nucleotídeos, são essenciais para o desenvolvimento de células e organismos, devido a sua capacidade de regulação da expressão proteica. Fazem isso por meio do silenciamento de genes, indução de degradação ou desanilação da sequência de interesse (GROBHANS e FILIPOWICZ, 2008). Os micro-RNAs ligam-se seletivamente por pareamento de bases à região não traduzida (3' UTR, do inglês, *untranslated region*), que são seções no RNA mensageiro (RNAm). Dessa forma, o RNAm pode ser degradado ou a tradução de proteínas será inibida ou estimulada, a depender do

grau de complementariedade entre o micro-RNA e o RNAm (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006; HUTVÁGNER, ZAMORE, 2002; ZENG *et al.*, 2003).

Foi descoberto em um estudo com *Caenorhabditis elegans*, um nematódeo, no qual identificou-se o primeiro gene (gene *lin-14*) alvo do microRNA (RICARTE FILHO, KIMURA, 2006).

A geração e maturação de micro-RNA depende da ação funcional da enzima *Dicer*. Micro-RNAs no núcleo celular são transcritos pela enzima RNA polimerase II, dando origem aos pri-microRNAs (primários) que serão clivados pela enzima Droscha originando o pré-miRNA (precursor), com cerca de 70 nucleotídeos, contendo um trecho de fita dupla e uma alça de fita simples, formando uma estrutura denominada hairpin. Esse pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela proteína exportina-5, onde finalmente será clivado pela *Dicer*, que então se liga ao pre-miRNA retirando o duplex de micro-RNA, gerando o micro-RNA maduro. O micro-RNA maduro é carregado no complexo RISC (do inglês, *RNA induced silencing complex*) que o direciona até o RNAm alvo para reprimir a tradução ou em alguns casos levar a degradação do RNAm (Figura 3) (FRANÇA *et al.*, 2010).

Os adipócitos secretam micro-RNAs e vários deles já estão descritos como importantes no processo de diferenciação e adipogênese (MCGREGOR; CHOI., 2011). São liberados do tecido através de vesículas, os exossomos, estruturas que o protegem e evitam sua degradação, para atuar tanto em genes distantes quanto em genes locais (MORI *et al.* 2012, 2014). Já estão descritos, por exemplo o miR-193b-365 e miR-155 relacionados à adipogênese do tecido marrom, e o miR-143 e miR-103 como importantes no processo de diferenciação do adipócito branco e na resistência insulínica. (THOMOU *et al.*, 2017)

Sendo assim, alterações e desregulação desses micro-RNAs influenciam os processos de proliferação e diferenciação de adipócitos, e também modulam a inflamação pois são capazes de ativar macrófagos e outras células do sistema imune (KAMANEMI *et al.*, 2013). Micro-RNAs estão envolvidos tanto na maturação de monócitos em macrófagos quanto na regulação da polarização para o perfil M1, macrófago pró-inflamatório ou perfil M2, macrófago anti-inflamatório. Esses diferentes perfis, promovem alterações fisiológicas e metabólicas importantes, são cruciais no estabelecimento da obesidade e doenças associadas (CHANG *et al.*, 2014).

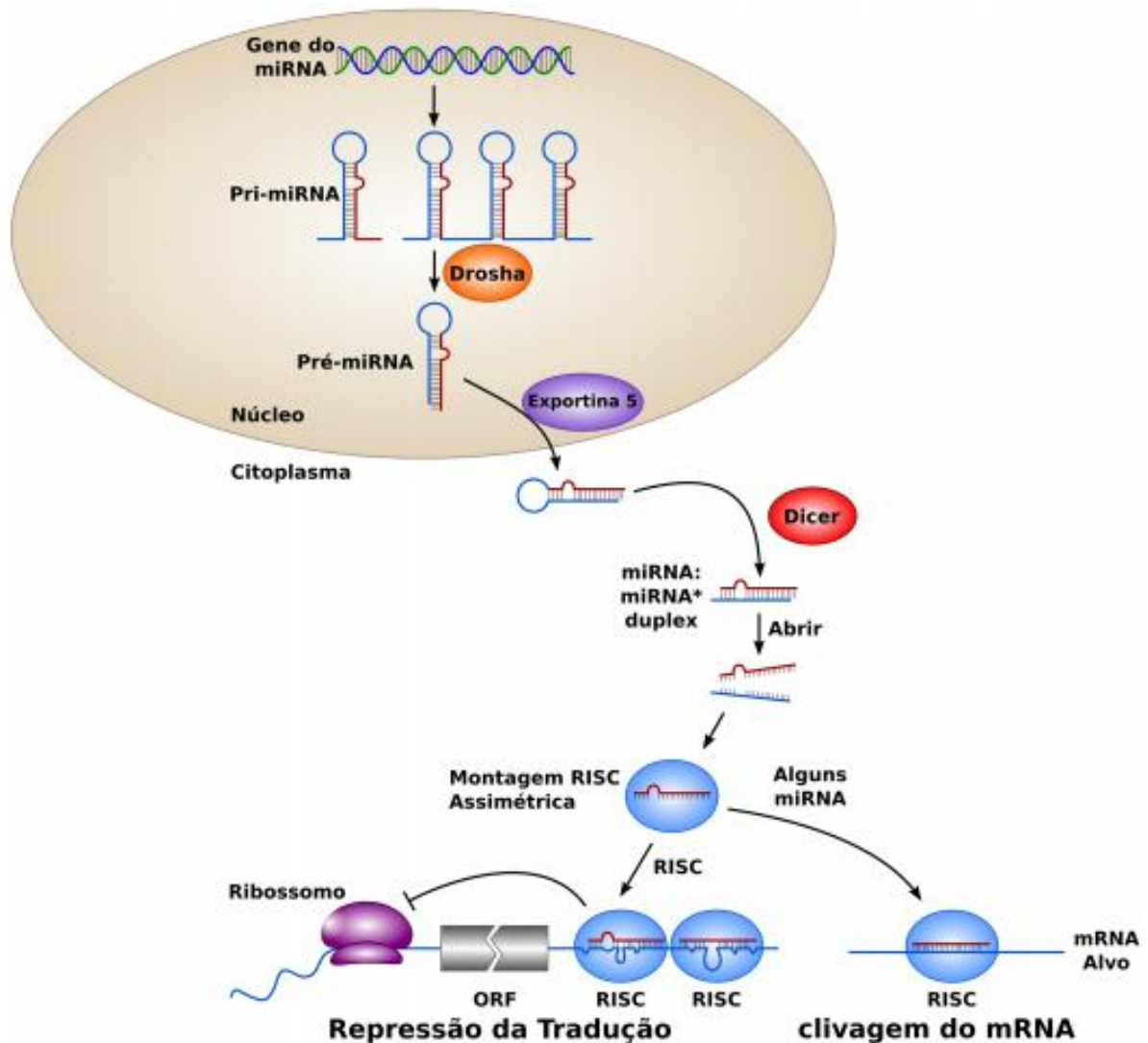


Figura 3. Biogênese de mi-RNAs. Micro-RNAs são transcritos pela enzima RNA polimerase II, dando origem ao pri-miRNA que tem sua estrutura em forma de grampo (*hairpin*) ao ser processado pelo complexo enzimático Drosha cliva esse Pri-miRNA em Pré-miRNA que é transportado pro citoplasma, onde é reconhecido pela enzima Dicer que cliva essa estrutura *hairpin* liberando o duplex de mi-RNA. O complexo argonauta e RISC se ligam a cada uma das fitas, uma das fitas vai reconhecer o RNAm por complementariedade de sequência gerando micro-RNA maduro. (Adaptado de <http://uranus.mtveurope.org/wklim/research.html>)

1.3 Macrófagos do tecido adiposo e corpúsculos lipídicos

Macrófagos são as células do sistema imunológico mais presentes no tecido adiposo (FERRANTE *et al.*, 2013). Eles são recrutados e ativados por ácidos graxos, quimiocinas, adipocinas, micro-RNAs e outros produtos secretados por adipócitos normais e adipócitos senescentes em processo de morte. Devido a sua capacidade fagocitária esses macrófagos contribuem para homeostase e renovação desse tecido (ARNER, 2015).

Sendo assim, devido a sua alta capacidade fagocitária, os macrófagos são recrutados para o tecido adiposo, atraídos principalmente por ácidos graxos livres e então se organizam em volta do adipócito morto na tentativa de realizar o tamponamento lipídico, formando estruturas em forma de coroa, as *crown like structures* (CLS). Tais estruturas constituem focos inflamatórios que contribuem para a manutenção do estado inflamado seja local ou sistêmico. Visto que, os macrófagos locais quando ativados também liberam substâncias quimiotáticas (BOUTENS e STIENSTRA, 2016).

Em linhas gerais, na tentativa de manter a homeostase, essa interação adipócitos e macrófagos, não é benéfica do ponto de vista imunológico pois favorece o estabelecimento de um estado inflamatório de baixo grau por meio da modulação do microambiente do tecido. Dessa forma, a literatura evidencia por exemplo, que o organismo do indivíduo se torna mais susceptível ao desenvolvimento de resistência à insulina e a diabetes tipo 2 (BOUTENS e STIENSTRA, 2016).

Olhando para outra condição, na qual ácidos graxos e lipídeos ao invés de serem liberados ficam armazenados na célula, temos os corpúsculos lipídicos. Corpúsculos lipídicos (CLs) são considerados marcadores de atividade celular e mediadores inflamatórios. São organelas citoplasmáticas que contêm lipídeos neutros, incluindo triglicerídeos e ésteres de colesterol, envoltos por uma monocamada lipídica (BOZZA e VIOLA, 2010; DIAS *et al.*, 2014).

A ativação de macrófagos leva a biogênese desses corpúsculos lipídicos no seu interior. Dessa forma, a biogênese de corpúsculos lipídicos consiste num importante marcador de ativação celular. Esses lipídeos consistem em substratos para a síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. E reserva energética importante para manutenção celular, proliferação e fagocitose por exemplo (BOZZA, *et al.*, 2009). Entretanto, em células tumorais, a inibição da

formação de CLs mostrou-se benéfica para o tratamento e prevenção de cânceres, uma vez que, o aumento da biogênese de CLs está relacionado com uma maior agressividade de tumores.

Portanto, no presente estudo, visou-se analisar a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos modulada por tecidos adiposos, de forma a contribuir para melhor compreensão do papel dos tecidos adiposos na ativação dessas células.

2 JUSTIFICATIVA

Micro-RNAs além de regularem a expressão gênica atuando em etapas de transcrição de genes ou tradução de proteínas, nos últimos anos tem se mostrado como reguladores essenciais do desenvolvimento e da função do tecido adiposo.

Estudos recentes demonstraram que o tecido adiposo secreta micro-RNA exossômicos que podem atuar na regulação gênica de tecidos e órgãos distantes do local que foram secretados (THOMOU *et al.*, 2017). Sabe-se que o tecido adiposo modula a inflamação, devido a diversidade de adipocinas secretadas, e pelo recrutamento e infiltração de macrófagos e linfócitos nesse tecido, no entanto, o papel dos micro-RNAs nesse processo ainda não está totalmente elucidado.

Nesse sentido, haja vista que os tecidos adiposos brancos e marrons sejam importantes para a modulação da inflamação, formulamos a hipótese que produtos da secreção desses, ativam macrófagos, e que os micro-RNAs do tecido adiposo são importantes para interferir na geração de uma resposta local ou sistêmica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a relação e capacidade imunomoduladora dos tecidos adiposos brancos e marrons na ativação de macrófagos, analisando o papel dos micro-RNAs neste processo.

3.2 Objetivo Específico

Verificar se os diferentes tecidos adiposos, brancos e marrons, na ausência e presença de micro-RNAs, modulam a biogênese de corpúsculo lipídico em macrófagos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 *Dicer*^{flox+/+} (*lox*), ou seja, camundongos que carregam o alelo *Dicer* floxado e camundongos C57BL/6 *Adiponectina*^{cre+} para podermos gerar os camundongos *Adiponectina*^{cre+}*Dicer*^{flox+/+} (*Adicer* KO). Os camundongos do sistema cre-lox foram cedidos pelo Professor Marcelo Mori, do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual da Universidade de Campinas. Após os cruzamentos os animais foram genotipados por PCR (Applied Biosystems) (Anexo B), utilizando DNA isolado de um pequeno pedaço da cauda, para separação dos nocautes e *lox*. Todos os animais foram mantidos nas instalações do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), todos os cuidados e experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais aprovadas pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UnB, com projeto aprovado número 52306/2014 (Anexo 1).

Os animais *lox* foram utilizados para a obtenção de macrófagos derivados da medula óssea, e para a obtenção dos tecidos adiposos brancos e marrons animais *Adicer* KO e *lox* foram utilizados.

4.2 Macrófagos derivados da medula óssea

Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram obtidos como descrito previamente por Marim *et al.*, (2010). Foram extraídos o fêmur e a tíbia de camundongos C57BL/6 *lox*, e após a limpeza completa desses ossos, foram cortadas suas extremidades e com auxílio de uma seringa de 5 mL e agulha 25G, a cavidade interna desses foi lavada com meio de diferenciação (RPMI 20/30). O meio de diferenciação consiste em RPMI 1640 (Gibco), 20% de soro fetal bovino (SFB- Gibco), 30% de sobrenadante de cultura de células da linhagem L-929 (LCCM- meio condicionado de células L929) que atua como uma fonte de M-CSF (fator de estimulação das colônias de macrófagos) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco). Esse processo foi realizado deixando as células com meio verterem para um falcon no gelo acoplado a um filtro de 0,40 µm (Greiner Bio-One). A suspensão de células

em meio obtida, foi centrifugada a 300 g, durante 5 minutos a 4°C, o sedimento foi ressuspenso em PBS 1X estéril e em seguida centrifugado nas mesmas condições anteriores, por fim as células foram ressuspendidas utilizando o meio de diferenciação e transferidas para placas de Petri de 90 mm. Após 4 dias de incubação em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂ foram adicionados mais 7 mL do meio de diferenciação. O processo de diferenciação em macrófagos tem duração de 7 dias após a incubação inicial, decorrido esse período o sobrenadante da cultura foi descartado e as placas de Petri foram lavadas com 6 mL de PBS 1X estéril e gelado. Com o auxílio do espalhador de células tipo rodo, passando levemente sobre as placas, as células foram desaderidas e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Para a contagem, as células foram ressuspendidas em meio contendo RPMI contendo 5% de LCCM e 10% de SFB, 10 µL dessa suspensão foram adicionadas a 90 µL do corante Azul de Tripán, e 10 µL desse preparado foi aplicado na câmara de Neubauer para contagem. A partir disso foi feito o plaqueamento de acordo com o experimento a ser realizado.

4.3 Extração de tecidos adiposos brancos e marrons

Animais *Adicer* KO e *lox* foram eutanasiados em câmara de CO₂. A retirada dos tecidos foi baseada no protocolo descrito por Mann *et al.*, (2014), foi feita a assepsia da superfície externa do animal com álcool 70%. Para obtenção do tecido adiposo marrom (BAT) as camadas dérmicas da região interescapular foram retiradas e dessa forma foi observado uma camada de gordura branca, na qual logo abaixo encontra-se o BAT. Com o auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica retiramos essa região e dissociamos os diferentes tecidos. O tecido adiposo branco foi retirado da região supra epididimal, após a incisão no peritônio do animal foi possível localizá-lo nas laterais do abdômen. Os tecidos foram pesados e em seguida foi adicionado a eles meio condicionado contendo RPMI com 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de BSA (albumina sérica bovina), gentamicina 40 µg/mL, anfotericina B 0,25 µg/mL e cloranfenicol 10 µg/mL. Esses tecidos foram seccionados separadamente a fim de aumentar a superfície de contato com o meio condicionado e incubados em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24h em placa de 6 poços.

4.4 Co-cultivo de macrófagos com o sobrenadante da cultura dos tecidos adiposos

Os macrófagos foram transferidos para placas de cultivo de 24 poços na concentração 5×10^5 células/poço. Após 48h de repouso incubados a 37 °C em estufa úmida e 5% de CO₂, o sobrenadante das placas foi retirado, cada poço foi lavado cuidadosamente com PBS 1x estéril e foram adicionados os seguintes estímulos: 1) meio de cultura; 2) LPS 500 ng/mL; 3) Sobrenadante da cultura do tecido adiposo marrom do animal *lox* (BAT *lox*); 4) Sobrenadante da cultura do tecido adiposo branco do animal *lox* (WAT *lox*); 5) Sobrenadante da cultura do tecido adiposo marrom do animal *Adicer* KO (BAT *Adicer*) e 6) Sobrenadante da cultura do tecido adiposo branco do animal *Adicer* KO (WAT *Adicer*). Após 24h da interação com os estímulos o sobrenadante foi transferido para eppendorfs para futuras análises e foi realizada a marcação celular de acordo com o experimento de interesse.

4.5 Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo

Para análise da presença de corpúsculos lipídicos, a sonda fluorescente BODIPY 493/503 (Life Technologies) foi utilizada, devido a sua capacidade de se associar aos lipídeos neutros intracelulares.

Após o procedimento descrito anteriormente, as células foram desaderidas com PBS 1X gelado, centrifugadas a 300 g, durante 5 minutos a 4 °C, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas com 100 µL da solução de Bodipy/PBS na proporção de 1/5000 a 4 °C ao abrigo de luz durante 30 minutos, exceto os poços não marcados, utilizados como controle da fluorescência, que não devem ser marcados com essa solução contendo a sonda. Em seguida as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS 1X, após essa etapa foram ressuspensas em 400 µL de paraformaldeído 1% para fixação. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. O *gate*, quando aplicado, foi plotado na população de células viáveis, excluindo-se os restos celulares da análise. Os histogramas e médias de intensidade de fluorescência (MFI) foram feitos no software FlowJo V10 (Tree Star Inc). Experimento feito em triplicata.

4.6 Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos por *Oil Red*

Para análise da presença de corpúsculos lipídicos por microscopia óptica utilizou-se o corante lipofílico Oil Red O (Sigma Aldrich) e a hematoxilina um corante de caráter básico capaz de se associar e corar estruturas ácidas da célula, como por exemplo, núcleos celulares.

Após o procedimento descrito no item 4.4 e retirada do sobrenadante da cultura celular mantida em placa de 24 poços contendo lamínulas, as células foram fixadas com formalina 3,7% durante 10 minutos, em seguida as células foram lavadas três vezes com água Milli-Q e expostas por 2 minutos a propilenoglicol (PEG) 100 %. Decorrido esse tempo, o excesso de PEG 100% foi retirado e as células foram incubadas com Oil Red O 0,5 % em isopropanol por 40 minutos. Após essa etapa, o Oil Red foi retirado e as células foram lavadas por 1 minuto com PEG 60% e 3 vezes com água Milli-Q por 30 segundos. Por fim, foram marcadas com hematoxilina por 5 segundos e após novas lavagens, as lamínulas foram transferidas para lâminas e as imagens foram analisadas utilizando microscópio de luz acoplado a câmera (ZEISS, EUA) e o software Zen, com as objetivas de 20x e 40x.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliamos a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos derivados da medula óssea após serem estimulados pelos produtos da secreção dos tecidos adiposos brancos e marrons de animais que continham micro-RNAs (*lox*) e de animais com ausência de micro-RNAs nesses tecidos (Adicer KO).

A partir disso, verificamos que, os macrófagos quando estimulados pelos tecidos adiposos brancos, apresentaram uma maior formação de corpúsculos lipídicos (CLs) quando comparados a aqueles não estimulados ou estimulados com tecidos adiposos marrons (Figuras 2 e 3). Esse aumento pode ser observado através da citometria e confirmado pela microscopia através da coloração com Oil Red.

Tal fato demonstra que, os tecidos adiposos liberam produtos que induzem a inflamação e ativam macrófagos. Segundo Boutens e Stienstra, (2016) esses produtos podem ser ácidos graxos, adipocinas, sobretudo a MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) e hormônios que ativam e recrutam células imunes contribuindo para a manutenção do microambiente pro-inflamatório do tecido adiposo.

O LPS (lipopolissacarídeo) presente na membrana externa de bactérias gram negativas, foi utilizado como controle positivo no presente estudo e também induziu a biogênese de corpúsculos lipídicos quando comparado ao não estimulado (MENG E LOWELL, 1997)

Importantes marcadores da atividade celular, os CLs também fornecem energia necessária para manutenção da célula, mas por outro lado também podem fornecer nutrientes e favorecer a sobrevivência de patógenos (DIAS *et al.*, 2014) e em indicar mal prognóstico em tumores.

Outras situações que levam ao aumento de CLs em diferentes células do sistema imunitário, são os processos alérgicos, estímulos virais, parasitários, bacterianos, e em patologias como o câncer, obesidade (BOZZA E VIOLA, 2010; MELO *et al.*, 2011; MURPHY, 2012) e na aterosclerose (PAUL *et al.*, 2008).

Dando continuidade, ao comparar os diferentes estímulos, os que mais induziram CLs foram os tecidos de camundongos nocautes para micro-RNAs, evidenciando assim, a influência dos micro-RNAs no controle da ativação celular, o que corrobora com os achados da literatura (KAMANEMI, *et al.* 2013; MCGREGOR e CHOI, 2011).

Isso demonstra que os micro-RNAs presentes no tecido adiposo tem efeitos supressores na ativação de macrófagos. Adicionalmente, em um estudo Zhuang *et al.*, (2012), descreveu que camundongos nocautes para mi-RNA-223 tiveram respostas inflamatória aumentadas, resistência insulínica e polarização de macrófagos para um perfil mais anti-inflamatório, cuja hipótese consiste na supressão do gene pró-inflamatório Pknox 1, embora ainda não está muito claro isso, coaduna com a o fato de que os micro-RNAs controlam a inflamação e ativação de células imunes.

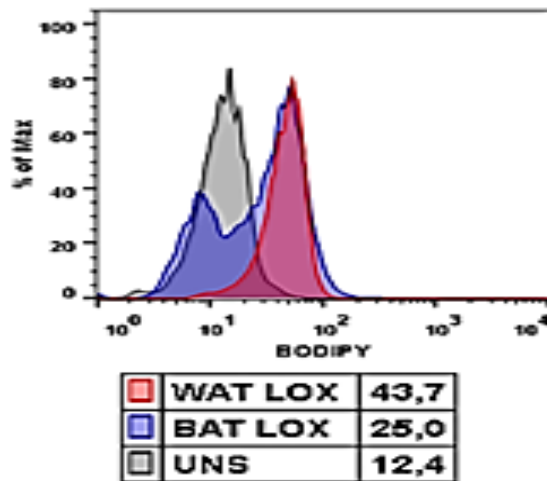
Mori *et al.*, (2014) também mostrou que em *Adicer* KO além da lipodistrofia (alteração na distribuição da gordura) caracterizada pela diminuição do tecido adiposo branco, é possível concluir que nesses animais os processos inflamatórios estariam aumentados bem como resistência insulínica.

Em contrapartida, outro trabalho demonstrou que micro-RNAs regulam a adipogênese e a obesidade, no entanto seu papel é determinado pelo local onde estão, dessa forma foi observado que diferentes tecidos adiposos apresentam diferentes perfis de expressão de micro-RNAs (MCGREGOR; CHOI., 2011).

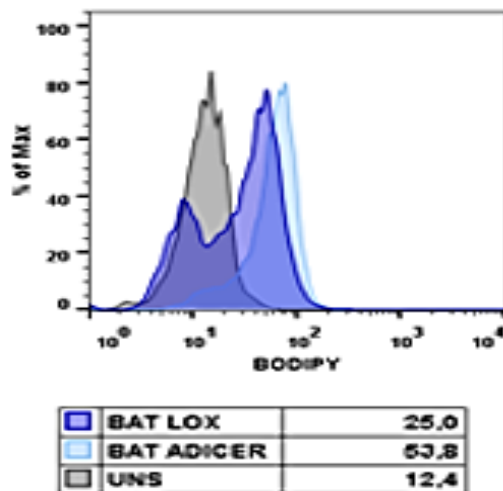
Além disso, ao analisar os estímulos do grupo nocaute, o tecido adiposo branco foi o que apresentou a maior média de fluorescência (MIF) de 54,2 nm. Que significa que foi o tecido que mais conseguiu ativar macrófagos. WAT induz uma maior ativação de macrófagos.

Isso pode ser explicado, ao comparamos o BAT e o WAT, o WAT apresenta um caráter mais pró-inflamatório, rico em células imunológicas principalmente macrófagos infiltrados, é um tecido mais inflamado, dessa forma possivelmente liberam mais produtos capazes de induzir ativação e recrutar células imunes. Enquanto que o marrom, tem características antagônicas na ativação de células imunes, representando assim um importante alvo de estudo devido ao seu perfil menos inflamatório.

1)



2)



3)

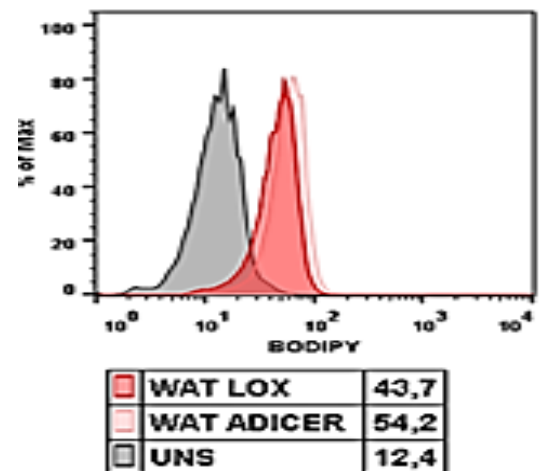
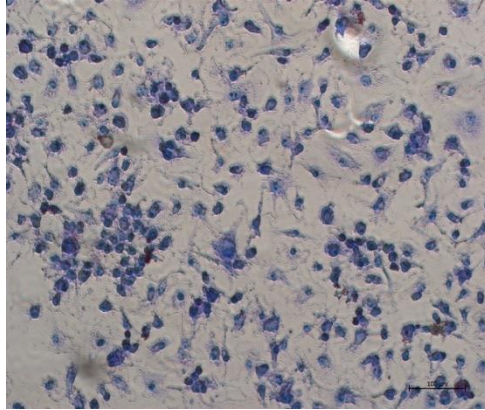
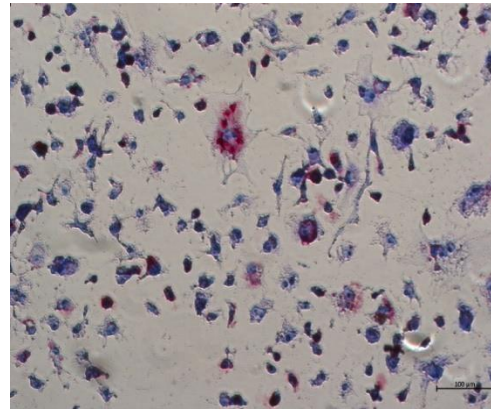


Figura 4: Sobrenadante dos tecidos adiposos (BAT e WAT) de Adicer e Lox induz biogênese de corpúsculo lipídico em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM). Macrófagos diferenciados estimulados por 24h com sobrenadantes de tecido adiposo (WAT e BAT) de animais Adicer e Lox. Controles: UNS (células não estimuladas) e LPS (lipopolissacarídeo). As células foram marcadas com a sonda lipofílica Bodipy (FL-1) e adquirida em citômetro FACS Calibur. 1) WAT LOX: tecido adiposo branco de animais lox; BAT LOX: tecido adiposo marrom de animais lox; UNS: não estimulado; 2) BAT LOX e BAT adicer (tecido adiposo marrom de animaisno caute para micro-RNA) E 3) WAT LOX E WAT ADICER.

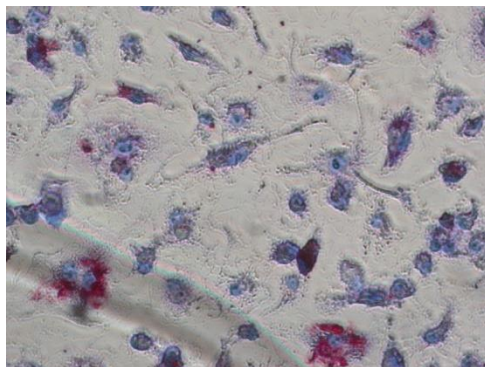
1. A) UNS



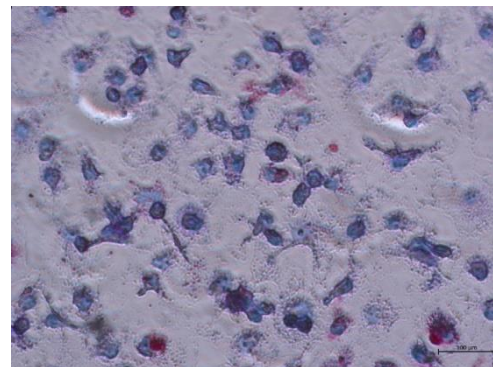
B) LPS



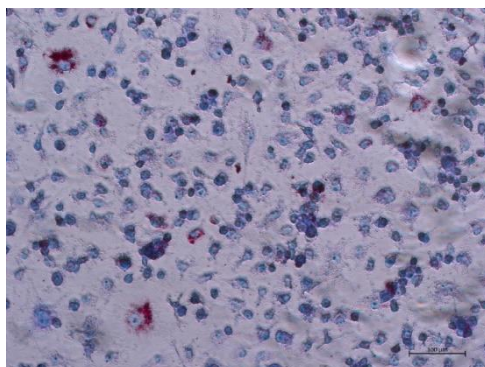
2. A) BAT Adicer



B) BAT LOX



3. A) WAT Adicer



B) WAT LOX

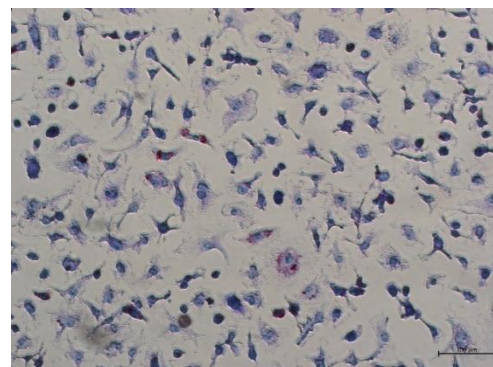


Figura 5. Microscopia óptica de macrófagos corados com Oil Red e hematoxilina. 1) A) Macrófagos (Não estimulado- UNS) e B) LPS no aumento 20x; 2) a) Adicer BAT (macrófagos estimulados com tecido adiposo marrom de Adicer KO) e b) BAT lox (macrófagos estimulados com tecido adiposo marrom de Lox), ambos no aumento 40x; 3) WAT Adicer (macrófagos estimulados com tecido adiposo branco de Adicer KO) e b) WAT lox (macrófagos estimulados com tecido adiposo branco de Lox) ambos no aumento 20x. As imagens obtidas por microscópio de luz acoplado a câmera (ZEISS, EUA) e o software Zen.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos foi possível concluir que ao compararmos BAT e WAT, os produtos da secreção dos tecidos adiposos brancos de animais *lox* induzem maior ativação de macrófagos do que produtos da secreção dos tecidos adiposos marrons de animais *lox*.

No entanto, BAT e WAT de animais *Adicer*, não apresentaram diferença significativa na ativação de macrófagos. Comparando as condições: ausência e presença de micro-RNAs, respectivamente, *Adicer* e *lox*, na ausência de micro-RNAs foi observada uma maior ativação de macrófagos. Portanto, os micro-RNAs de ambos os tecidos adiposos desempenham um papel importante no controle dessa ativação de macrófagos e no estado inflamatório desse tecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNER, P., & Kulyté, A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, 11(5), 276–288, 2015.

BALTIMORE D, MP Boldin, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD MicroRNAs: novos reguladores do desenvolvimento e função da célula imune. **Nat Immunol** 9: 839-845, 2008.

BARBATELLI, G. et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 6, p. E1244-E1253, 2010.

BHATTACHARYYA, Suvendra N. et al. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. **Cell**, v. 125, n. 6, p. 1111-1124, 2006.

BOUTENS, Lily; STIENSTRA, Rinke. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. **Diabetologia**, v. 59, n. 5, p. 879-894, 2016.

BOZZA, P.T. & VIOLA, J.P. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 82(4–6), 243–250, 2010.

BRESTOFF, Jonathan R.; ARTIS, David. Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. **Cell**, v. 161, n. 1, p. 146-160, 2015.

CHANG, Richard et al. MicroRNAs control macrophage formation and activation: the inflammatory link between obesity and cardiovascular diseases. **Cells**, v. 3, n. 3, p. 702-712, 2014.

CINTI, S. White, Brown, Beige and Pink: A Rainbow in the Adipose Organ. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, 2018.

DIAS, F. F., Zarantonello, V. C., Parreira, G. G., Chiarini-Garcia, H., & Melo, R. C. N. The Intriguing Ultrastructure of Lipid Body Organelles Within Activated Macrophages. **Microscopy and Microanalysis**, 20(03), 869–878, 2014.

FERRANTE JR, Anthony W. The immune cells in adipose tissue. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. s3, p. 34-38, 2013.

FRANÇA, Natália Regine de et al. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

FRANCISQUETI, Fabiane Valentini; NASCIMENTO, André Ferreira do; CORRÊA, Camila Renata. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**, p. 81-89, 2015.

GIORDANO, Antonio; FRONTINI, Andrea; CINTI, Saverio. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 6, p. 405, 2016.

GROBHANS, Helge; FILIPOWICZ, Witold. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 414, 2008.

HUTVÁGNER, György; ZAMORE, Phillip D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science**, v. 297, n. 5589, p. 2056-2060, 2002.

KAMANEMI, S. et al. MicroRNA Regulated Macrophage Activation in Obesity. **J Nutr Food Sci**, v. 3, n. 220, p. 2, 2013.

KLOTING, N., S. BERTHOLD, et al. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. **PLoS One**, v.4, n.3, p. e4699. 2009.

KOSTELI, Aiki et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 10, p. 3466-3479, 2010.

LODISH HF, *et al.*, Micromanagement do sistema imunológico por microRNAs. **Nat Rev Immunol** 8: 120-130, (2008).

MANN, Adrien et al. Localization, identification, and excision of murine adipose depots. *Journal of visualized experiments: JoVE*, n. 94, 2014.

MARIM, Fernanda M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15263, 2010.

MCGREGOR, R A and M S CHOI. microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. **Current molecular medicine** vol. 11 (4): 304-16, 2011.

MELO, R.C.N., *et al.*/Lipid bodies in inflammatory cells: Structure, function, and current imaging techniques. **J Histochem Cytochem** 59(5), 540–556, (2011).

MENG, Fanying; LOWELL, Clifford A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. **Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 9, p. 1661-1670, 1997.

MORI, Marcelo A. et al. Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 8, p. 3339-3351, 2014.


MORRONI, Manrico et al. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 48, p. 16801-16806, 2004.

MURPHY, D.J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: From archaea to mammals. **Protoplasma** 249(3), 541–585.

- PAUL, Antoni et al. Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. **Circulation research**, v. 102, n. 12, p. 1492-1501, 2008.
- PINTO, Wagner de Jesus. A função endócrina do tecido adiposo. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111-120, set. 2014.
- PROENCA, A. R., R. A. Sertie, et al. New concepts in white adipose tissue physiology. **Braz J Med Biol Res**, v.47, n.3, Feb, p.192-205. 2014
- RICARTE FILHO, Júlio; KIMURA, Edna Teruko. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102-1107, 2006.
- SAELY, C. H., Geiger, K., & Drexel, H. Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. **Gerontology**, 58(1), 15–23(2012).
- SCHAFFLER, A. et al. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. **Endocrine reviews**, v. 27, n. 5, p. 449-467, 2006.
- SHAMSI, Farnaz; ZHANG, Hongbin; TSENG, Yu-Hua. MicroRNA regulation of brown adipogenesis and thermogenic energy expenditure. **Frontiers in endocrinology**, v. 8, p. 205, 2017.
- TRAN, C. M., S. MUKHERJEE, et al. Rapamycin blocks induction of the thermogenic program in white adipose tissue. **Diabetes**, Feb 8. 2016.
- THOMOU, Thomas et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. **Nature**, v. 542, n. 7642, p. 450, 2017.
- VITALI, Alessandra et al. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. **Journal of lipid research**, p. jlr. M018846, 2012.
- ZENG, Yan; YI, Rui; CULLEN, Bryan R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 9779-9784, 2003.
- ZHANG, Fang et al. An Adipose tissue atlas: an image-guided identification of human-like BAT and beige depots in rodents. **Cell metabolism**, v. 27, n. 1, p. 252-262. e3, 2018.
- ZHUANG, C. et al., A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. **Circulation**, vol. 125, pp. 2892–2903, 2012.


ANEXOS

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética




Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal


Brasília, 02 de julho de 2014.



DECLARAÇÃO

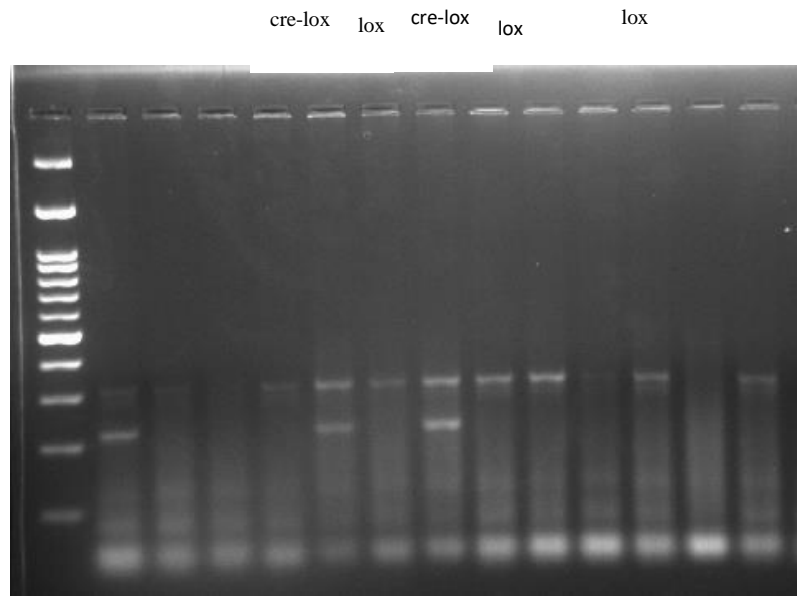
Declaramos que o projeto intitulado "**ESTUDO DO PAPEL DO METABOLISMO LIPÍDICO, INFLAMAÇÃO E RESPOSTA IMUNE INATA NA OBESIDADE E NO CÂNCER DE MAMA.**", UNBDoc n.º 52306/2014, sob responsabilidade da Professora Kelly Grace Magalhães foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo B- Genotipagem



CRE-LOX: 200 e 300 pb

LOX: 300 pb