

BRUNA TELES SOARES BESERRA

**EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A
AÇÃO DA ESTIMULAÇÃO BETA3-ADRENÉRGICA E DA TRIIODOTIRONINA NO
TECIDO ADIPOSEO**

Brasília, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BRUNA TELES SOARES BESERRA

**EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A
AÇÃO DA ESTIMULAÇÃO BETA3-ADRENÉRGICA E DA TRIIODOTIRONINA NO
TECIDO ADIPOSE**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Co-Orientadora: Profa. Dra. Michella Soares
Coelho

Brasília
2018

Aos meus pais, Pedro, Aurora e Francisca, por serem meus exemplos de coragem,
força e dedicação. Essa conquista é de vocês!

Ao meu grande amor Conrado, por ser meu maior incentivador e companheiro de
todas as horas. Obrigada por me completar e me fazer feliz.

Às minhas irmãs Mariana, Sibeles e Isadora, companheiras de toda a vida. Obrigada
pelo amor e amizade.

Dedico este trabalho...

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas infinitas graças concedidas e pela presença marcante em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Angélica Amorim Amato, por toda a paciência, pelas brilhantes correções e colocações, pelo incentivo e apoio em todos os momentos. Foi um presente tê-la como orientadora no doutorado, e sinto-me privilegiada pela convivência dos últimos anos. Você é um exemplo de pessoa e profissional. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Teresa Helena Macedo da Costa, exemplo de profissional e ser humano. Agradeço por todos os momentos de contribuição na minha formação docente.

À Profa. Dra. Michella Soares Coelho, pelos ensinamentos e pela dedicação para que esta tese fosse bem executada.

Aos professores do Laboratório de Farmacologia Molecular (Farmol), por todos os ensinamentos durante esses anos e por me prepararem para a pesquisa. Todos vocês de alguma forma contribuíram para tornar possível este momento.

À minha querida amiga Carolina, pela amizade, por toda ajuda, pela força nos momentos mais difíceis desta etapa e por compartilhar dias e acontecimentos felizes.

Às minhas colegas de grupo de orientação, Fernanda, Nadyellem, Camila e Louise. Sem vocês essa jornada teria sido muito mais árdua. Obrigada pela oportunidade de conhecê-las e por dividir os momentos de alegrias e dificuldades.

A todos os meus colegas do Farmol: Sidney, Cinthia, Henrique, Isabel, Kaian, Caroline, Simone, Rilva, Luciano, Nara, Daniela, Laiza, Michelle, Anna, Camila, Rafael, Mariella, Gleice, Sara, Rayza, Paloma, Cibele, Alana e Ana Carolina. Agradeço pela agradável convivência dentro e fora do laboratório, pelas importantes contribuições científicas e por tornar mais leve e alegre toda essa caminhada.

À Glorinha e a Tercia por sempre estarem dispostas a ajudar.

Ao veterinário Rafael e ao técnico do biotério Derison, pela ajuda nos cuidados com os animais.

A todos os meu colegas do Núcleo de Nutrição: Prof. Dr. Caio, Profa. Dra. Marcela, Profa. Dra. Sandra, Alessandra, Lara, Laís e Luís, por todo acolhimento e amizade.

À minha sogra Francisca e aos meus cunhados Caio e Geraldo, por ter me acolhido na nova família e por todo apoio e torcida em todos os momentos desta caminhada.

À família Teles, Beserra e Silva, pelo apoio, carinho e motivação.

Aos meus queridos amigos Dani, Cicília, Milena, Ana Raquel, Macell, Paloma, Amanda, Indhevysk, Eva, Eleninha, Jéssica, David, Sabrina, Rafa, Camis e Thayz pela amizade, apoio e palavras de incentivo.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade e ao corpo docente por promover o aprendizado e crescimento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para execução desse projeto. Muito obrigada!

*“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão.....
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas,
que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim
e que valeu a pena”*

(Mário Quintana)

RESUMO

Introdução: A microbiota intestinal pode estar relacionada com a patogênese e progressão da obesidade, por meio da sua influência sobre processos metabólicos do hospedeiro, dentre eles o gasto energético. Este tem como um de seus componentes a termogênese adaptativa no tecido adiposo (TA) termogênico. Os principais estímulos à termogênese adaptativa são a sinalização β 3-adrenérgica e o hormônio tireoidiano (HT). **Objetivo:** Avaliar o efeito da modulação da microbiota intestinal sobre o efeito da sinalização β 3-adrenérgica ou pelo HT no TA. **Métodos:** Camundongos machos C57BL/6 foram alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica e divididos aleatoriamente em seis grupos contendo cinco animais cada: controle, antibióticos (ATB), agonista β 3-adrenérgico (CL316,243), triiodotironina (T3), antibióticos + CL316,243 e antibióticos + T3. Os animais foram tratados com ATB na água de beber (vancomicina 0,5 g/L e ciprofloxacina 0,2 g/L por 5 semanas), CL316,243 por via intraperitoneal (1 mg/kg/dia, 5 dias) e T3 por via intraperitoneal (10 μ g/dia, 3 dias). Foram avaliados ganho de peso corporal, ingestão hídrica, ingestão de energia, eficiência calórica, massa dos depósitos de TA e do fígado, expressão de genes relacionados à termogênese e à ação do HT no TA, concentração sérica de TSH e atividade da desidrodinase tipo 2 (DIO2) no tecido adiposo branco (TAB) subcutâneo axilar. **Resultados:** No cenário de dieta normolipídica, o CL316,243 reduziu a massa do TAB visceral e, na presença de ATB, reduziu a massa do TAB subcutâneo. O T3 reduziu a massa do TAB epididimal e, na presença de ATB, aumentou a massa do TA marrom (TAM). O CL316,243 ou T3 aumentaram a expressão de *Ucp1* no TAB e, na presença de ATB, houve acentuação da indução de *Ucp1* em resposta ao CL316,243. A modulação da microbiota reduziu a atividade da DIO2 e não modificou a concentração sérica de TSH. No cenário de dieta hiperlipídica, o uso CL316,243 e o T3, isoladamente e com ATB, não modificaram a massa de TAB. O T3 aumentou a massa do TAM. O CL316,243 e T3, isoladamente, aumentaram a expressão de *Ucp1* no TAB; o co-tratamento com ATB acentuou a indução de *Ucp1* pelo CL316,243 e diminuiu a indução deste transcrito pelo T3. No TAB inguinal, o uso de ATB acentuou a indução de *Ppargc1a* e *Dio2* pelo CL316,243 e pelo T3. No TAB epididimal, o tratamento com ATB diminuiu a indução de *Prmd16* pelo T3. A modulação da microbiota resultou em tendência de redução da atividade da DIO2 e não modificou a concentração sérica de TSH. **Conclusão:** Em condições basais, a microbiota intestinal não apresenta efeito significativo sobre a transcrição do gene que codifica a UCP-1 no TAB e no TAM, porém pode reduzir a ação do HT por diminuir sua ativação intracelular no TAB. Além disso, a resposta do TAB aos estímulos termogênicos clássicos parece ser influenciada de forma distinta pela microbiota intestinal.

Palavras-chave: microbiota intestinal; termogênese; tecido adiposo.

ABSTRACT

Background: Gut microbiota composition is associated with the pathogenesis and progression of obesity, possibly due to its major role in regulating components of the host's metabolic homeostasis, such energy expenditure. The latter comprises adaptive thermogenesis in adipose tissue (AT), which is classically stimulated by β 3-adrenergic signaling and thyroid hormone (TH). **Objective:** To evaluate the effect of gut microbiota modulation on the action of β 3-adrenergic signaling and TH on AT. **Methods:** Male C57BL/6 mice were fed a control or high fat diet and randomly assigned into six groups containing five animals each: control, antibiotics (ATB), β 3-adrenergic agonist (CL316,243), triiodothyronine (T3), antibiotics + CL316,243 and antibiotics + T3. The animals were treated with ATB in drinking water (vancomycin 0.5 g/L and ciprofloxacin 0.2 g/L for 5 weeks), CL316,243 intraperitoneally (1 mg/kg/day, 5 days) and T3 intraperitoneally (10 μ g/day, 3 days). Body weight gain, water intake, energy intake, caloric efficiency, AT and liver mass, expression of genes related to thermogenesis and to the action of TH in TA, serum TSH concentration and type 2 deiodinase (DIO2) activity in axillary subcutaneous white adipose tissue (WAT) were evaluated. **Results:** In the control diet scenario, CL316,243 reduced visceral WAT mass and, in the presence of ATB, reduced the mass of subcutaneous WAT. T3 reduced visceral (epididymal) WAT mass and, in the presence of ATB, increased brown AT (BAT) mass. Treatment with CL316,243 or T3 increased *Ucp1* expression in WAT and, in the presence of ATB, there was an enhancement of *Ucp1* induction in response to CL316,243. Modulation of gut microbiota reduced the activity of DIO2 in WAT and did not modify the serum TSH concentration. In the high fat diet scenario, CL316,243 and T3, alone or with ATB, did not modify the WAT mass, and T3 increased BAT mass. Both treatment with CL316,243 or T3 alone increased *Ucp1* expression in WAT; co-treatment with ATB enhanced the induction of *Ucp1* by CL316,243 and decreased the induction of this transcript by T3. In inguinal WAT, ATB treatment enhanced the induction of *Ppargc1a* and *Dio2* by CL316,243 and T3. In epididymal WAT, treatment with ATB decreased the induction of *Prmd16* by T3. Modulation of gut microbiota resulted in a trend towards reduction of DIO2 activity in WAT and did not modify the serum TSH concentration. **Conclusion:** Under basal conditions, the gut microbiota has no significant effect on the transcription of the gene encoding UCP-1 in TAB and TAM, but may reduce TH action in WAT by decreasing its intracellular activation. Moreover, WAT response to classical thermogenic stimuli seems to be influenced differently by the gut microbiota.

Keywords: gut microbiota; thermogenesis; adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia dos três tipos diferentes dos adipócitos.....	20
Figura 2 - Fatores que recrutam os adipócitos marrons, adipócitos bege ou ambos	25
Figura 3 - Tecido adiposo termogênico no tratamento da obesidade e desordens metabólicas associadas.	26
Figura 4 - Distribuição e composição das espécies de bactérias no trato gastrointestinal.....	27
Figura 5 - Microbiota intestinal e regulação da homeostase de energia.	33
Figura 6 - Mecanismo da termogênese adaptativa induzida pelo frio.	35
Figura 7– Peso corpóreo dos camundongos alimentados com dieta normolipídica no decorrer do estudo.	54
Figura 8 – Efeito do tratamento com antibióticos, durante 5 semanas, sobre a energia ingerida(A), eficiência calórica (B) e ingestão hídrica (C) em animais alimentados com dieta normolipídica.	55
Figura 9– Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade visceral em animais alimentados com dieta normolipídica.	56
Figura 10 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade subcutânea em animais alimentados com dieta normolipídica.	57
Figura 11 – Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa do TAM em animais alimentados com dieta normolipídica.	58
Figura 12 – Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa do fígado em animais alimentados com dieta normolipídica.	58
Figura 13 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Ucp1</i> em animais alimentados com dieta normolipídica.....	60
Figura 14 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor adrenérgico β 3 e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Ppargc1a</i> em animais alimentados com dieta normolipídica.....	61

Figura 15 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Prdm16</i> em animais alimentados com dieta normolipídica.....	62
Figura 16 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa da <i>Dio2</i> em animais alimentados com dieta normolipídica.	64
Figura 17 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa da <i>Thra</i> em animais alimentados com dieta normolipídica.	65
Figura 18 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa da <i>Thrb</i> em animais alimentados com dieta normolipídica.	66
Figura 19 -Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do hormônio T3 sobre a expressão relativa do transcrito do <i>Slc16a2</i> em animais alimentados com dieta normolipídica.	67
Figura 20 -Efeito dos antibióticos, agonista do receptor adrenérgico β 3 e do T3 sobre a concentração sérica de TSH em animais alimentados com dieta normolipídica. ...	68
Figura 21 -Efeito da modulação da microbiota intestinal por antibióticos sobre a atividade da desidrinase tipo 2 em animais alimentados com dieta normolipídica. ...	68
Figura 22– Peso corpóreo dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica no decorrer do estudo.	70
Figura 23 – Efeito do tratamento com antibióticos durante 5 semanas sobre (A) a energia ingerida, (B) eficiência calórica e (C) ingestão hídrica em animais alimentados com dieta hiperlipídica.	71
Figura 24 – Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e T3 sobre (A) a energia ingerida e (B) eficiência calórica em animais alimentados com dieta hiperlipídica.	73
Figura 25– Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade visceral em animais alimentados com dieta hiperlipídica.	74

Figura 26 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade subcutânea em animais alimentados com dieta hiperlipídica. .	75
Figura 27 Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa do TAM interescapular em animais alimentados com dieta hiperlipídica....	75
Figura 28 – Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa do fígado em animais alimentados com dieta hiperlipídica.....	76
Figura 29 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Ucp1</i> em animais alimentados com dieta hiperlipídica.	78
Figura 30 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Ppargc1a</i> em animais alimentados com dieta hiperlipídica.....	79
Figura 31 -Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Prdm16</i> em animais alimentados com dieta hiperlipídica....	80
Figura 32 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa da <i>Dio2</i> em animais alimentados com dieta hiperlipídica.	82
Figura 33 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Thra</i> em animais alimentados com dieta hiperlipídica.	83
Figura 34- Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Thrb</i> em animais alimentados com dieta hiperlipídica.....	84
Figura 35- Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de <i>Sc16a2</i> em animais alimentados com dieta hiperlipídica. ..	85
Figura 36 -Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre as concentrações séricas de TSH em animais alimentados com dieta hiperlipídica.	86
Figura 37 - Efeito dos antibióticos sobre a atividade da desidrinase tipo 2 em animais alimentados com dieta hiperlipídica.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes seletivos do adipócito branco, bege e marrom.....	23
Tabela 2 – Composição das dietas.	43
Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.	50

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ADR3	Receptor adrenérgico β 3
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinase ativada por adenosina monofosfato
Bmp	Proteína morfogenética óssea
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
D2	Desiodinase tipo II
Fgf21	Fator de crescimento de fibroblástico 21
FAF	Fator de adipócitos induzido por jejum
FXR	Receptor farnesoid X
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLP1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCT8	Transportador de Monocarboxilato 8
MYF5	Fator miogênico 5
PCR	Reação de polimerase em cadeia
Ppargc-1α	Coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PKA	Proteína cinase A
PPARγ	Receptor gama ativado pelo proliferador de peroxisoma gama
PRDM16	Proteína 16 contendo o domínio PR
PYY	Peptídeo tirosina tirosina
RAB	Receptor de ácido biliar
RT	Transcrição reversa
Sc116a2	Família dos portadores de soluto 16, membro 2
SEM	Erro padrão da média
SPF	Specific pathogen free
T3	Triiodotironina

T4	Tiroxina
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
Tm	Temperatura de dissociação
TR	Receptor do hormônio da tireoide
THRa	Receptor do hormônio da tireoide alfa
THRb	Receptor do hormônio da tireoide beta
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UCP1	Proteína desacopladora mitocondrial 1
UFC	Unidade formadora de colônia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 OBESIDADE E TECIDO ADIPOSEO TERMOGÊNICO	18
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL E METABOLISMO ENERGÉTICO	26
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E GASTO ENERGÉTICO	34
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 MÉTODOS	42
4.1 ANIMAIS	42
4.1.1 Grupos experimentais	42
4.1.2 Tratamento com antibiótico, agonista do receptor β 3-adrenérgico e hormônio triiodotironina (T3).....	44
4.1.3 Procedimentos experimentais	45
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TSH.....	46
4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	47
4.3.1 Isolamento do RNA total.....	47
4.3.2 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra	48
4.3.3 Tratamento do RNA com enzima DNase	48
4.3.4 Avaliação da integridade do RNA	49
4.3.5 PCR (reação de polimerase em cadeia) quantitativa em tempo real	49
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DEIODINASE TIPO II.....	51
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS	53
5.1 CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA NORMOLIPÍDICA.....	53
5.1.1 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa corporal	53
5.1.2 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a ingestão de energia, eficiência calórica e ingestão hídrica	54
5.1.3 Efeito modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade e a massa do fígado.....	55
5.1.4 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo, em resposta à estimulação β 3-adrenérgica e ao T3	59
5.1.5 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de genes relacionados à ação do hormônio tireoideano no tecido adiposo, em resposta à estimulação do β 3 adrenérgica e ao T3.....	63
5.1.6 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, estimulação β 3 adrenérgica e T3 sobre a concentração sérica de TSH	67
5.1.7 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a atividade da desiodinase tipo 2	68
5.2 CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA.....	69

5.2.1 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa corporal	69
5.2.2 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a ingestão de energia, eficiência calórica e ingestão hídrica	70
5.2.3 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a ingestão de energia e eficiência calórica em animais alimentados com dieta hiperlipídica	72
5.2.4 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade e massa do fígado	73
5.2.5 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo em resposta à estimulação β 3-adrenérgica e ao T3	76
5.2.6 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano no tecido adiposo em resposta à estimulação β 3 adrenérgica e ao T3	80
5.2.7 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, estimulação β 3 adrenérgica e T3 sobre a concentração sérica de TSH	85
5.2.8 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a atividade da desidrinase tipo 2	86
6 DISCUSSÃO	87
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
8 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	109
ANEXO A – DECLARAÇÃO DA CEUA	120

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica, caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo, acarretando prejuízos à saúde e favorecendo o surgimento de outras doenças crônicas (1). De acordo com o Ministério da Saúde, a obesidade pode ser compreendida como um agravo de caráter multifatorial, pois suas causas estão relacionadas a questões biológicas, históricas, ecológicas, econômicas, sociais, culturais e políticas (2).

Além dos fatores comumente envolvidos nas disfunções metabólicas presentes no indivíduo obeso, a microbiota intestinal pode estar relacionada com a patogênese e a progressão da obesidade. Dados de estudos em modelos animais e humanos indicam que a microbiota de indivíduos obesos apresenta, em comparação com os indivíduos eutróficos, diminuição da proporção entre os filos Bacteroidetes e Firmicutes (3, 4). Os mecanismos implicados na relação entre as alterações da microbiota intestinal não são completamente compreendidos, mas parecem envolver a capacidade de a microbiota intestinal influenciar a regulação do metabolismo energético e o armazenamento de gordura (5, 6). Este processo é decorrente de diversos mecanismos, dentre eles: a absorção de energia a partir da dieta, a regulação do armazenamento de gordura, lipogênese e oxidação de ácidos graxos, modulação de hormônios peptídicos gastrointestinais e indução da endotoxemia metabólica (7, 8).

Entre os processos metabólicos influenciados pela microbiota intestinal, destaca-se o gasto energético. Um de seus componentes é a termogênese não relacionada a tremores, ou termogênese adaptativa, resultante da atividade do tecido adiposo termogênico, constituído pelo tecido adiposo marrom e o adipócito bege. O aumento da quantidade e/ou atividade do tecido adiposo termogênico pode levar ao aumento do gasto energético, que pode ser favorável na prevenção e tratamento da obesidade (9).

Estudos recentes exploraram a associação entre a microbiota intestinal e os adipócitos termogênicos. Suarez-Zamorano e cols (10), em 2015, mostraram que a depleção da microbiota intestinal de camundongos resultou em aumento do recrutamento de adipócitos beges, sugerindo que componentes da microbiota possam apresentar influência negativa sobre este tipo celular. Chevalier e cols (11), por sua vez, mostraram que a exposição ao frio, um reconhecido estímulo para a

ativação do tecido adiposo termogênico, modifica a composição da microbiota intestinal, e que esta mudança está diretamente implicada no recrutamento de adipócitos beges.

A relação entre os diversos fatores que recrutam os adipócitos termogênicos e a microbiota intestinal, no entanto, ainda não foi explorada. Entre estes fatores, destacam-se os fatores tradicionalmente envolvidos na resposta ao frio, como a ação do hormônio tireoidiano e a sinalização pelas catecolaminas, e fatores identificados mais recentemente, como peptídeos natriuréticos, fator de crescimento de fibroblastos 21, catecolaminas, hormônios orexígenos, hormônio que mimetiza os efeitos do exercício, proteína morfogenética óssea e fator de crescimento endotelial vascular (12). Considerando-se estes aspectos, a hipótese deste estudo foi de que a modulação da microbiota intestinal a partir da administração de antibióticos promove recrutamento do adipócito bege em resposta à sinalização beta 3-adrenérgica e ao hormônio tireoidiano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OBESIDADE E TECIDO ADIPOSEO TERMOGÊNICO

A obesidade é definida como uma doença crônica de natureza multifatorial, envolvendo fatores ambientais, nutricionais e genéticos, acarretando grandes prejuízos à saúde (13). Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO) (1) a obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e representa um problema de abrangência mundial, sendo um dos maiores problemas de saúde pública no mundo.

No Brasil, a última Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009) mostrou aumento do peso da população em todas as regiões do país. Neste período, 49% da população brasileira adulta apresentavam excesso de peso e a obesidade esteve presente em 14,8% dos indivíduos. Ainda de acordo com esta pesquisa, a prevalência de obesidade na Região Centro-Oeste do país foi de 13,3% para os homens e 16,3% para as mulheres (14). Corroborando com estes achados, dados do último Estudo de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (2016), revelaram o aumento da obesidade no Brasil. Segundo o levantamento, uma em cada cinco pessoas no Brasil está acima do peso e a prevalência da obesidade cresceu 60% em dez anos, passando de 11,8%, em 2006, para 18,9%, em 2016, e é semelhante entre os sexos (15).

No mundo, mais de 1,9 bilhão de adultos maiores de 18 anos tinham excesso de peso em 2016. Destes, mais de 650 milhões eram obesos. No geral, cerca de 13% da população adulta mundial (11% dos homens e 15% das mulheres) era obesa em 2016. A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso, e mais de 700 milhões, obesos. O número de crianças com sobrepeso e obesidade no mundo poderá chegar a 75 milhões, caso nada seja feito (16).

Além de caracterizar-se como doença epidêmica, a obesidade representa fator de risco para diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, doenças cardiovasculares, cânceres e outras doenças (17). Adicionalmente, destaca-se que a causa fundamental da obesidade é o desequilíbrio crônico entre a ingestão de energia e o gasto energético, levando ao armazenamento do excesso de energia no tecido adiposo. Diante disso, os esforços para compreender a biologia do tecido adiposo,

de forma a produzir alvos terapêuticos, têm sido intensificados. O tecido adiposo é classificado em dois tipos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) (18).

O TAB é o principal local de armazenamento de energia, na forma de triglicerídeos, em uma única gotícula de lipídeo grande, que ocupa a maior parte do volume do adipócito branco, de forma que seu núcleo fica localizado periféricamente. Além disso, estas células possuem poucas mitocôndrias. O TAB é considerado importante órgão endócrino, por desempenhar papel crucial no armazenamento de energia, na sensibilidade à insulina e na regulação do apetite e saciedade (19, 20).

Em contraste, o TAM é especializado em dissipar energia. Os adipócitos marrons são células multiloculares, contendo muitas gotículas pequenas de lipídeos e um número relativo grande de mitocôndrias, sendo caracterizado como adipócito termogênico. Esses adipócitos expressam o *SLC25A7*, gene que codifica a UCP-1 (proteína desacopladora mitocondrial 1). Incorporada na membrana mitocondrial interna, a UCP-1 atua como um canal de prótons no espaço intermembranário da matriz mitocondrial. A ativação da UCP-1 resulta na dissipação da energia gerada para a cadeia transportadora de elétrons, na forma de calor (18, 21).

Em camundongos, os grandes depósitos do TAM incluem o interescapular, axilar e cervical. O sistema nervoso simpático é intimamente envolvido na regulação tanto do crescimento como na função termogênica do TAM. O adipócito marrom é inervado pelas fibras simpáticas que, em resposta à exposição ao frio, liberam norepinefrina para ativar de forma aguda a termogênese. A norepinefrina também desencadeia uma cascata de sinalização por meio da P38 MAPK (cinase 1 e 2 que regulam sinais ERK 1/2) e PGC-1 α (coativador 1 alfa do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais, PPAR γ) para aumentar a transcrição de genes que codificam proteínas relacionadas à termogênese e isso permite que o processo persista durante longo prazo de exposição ao frio. Além disso, a exposição ao frio estimula a expansão do TAM por ativação da proliferação e diferenciação de células precursoras do adipócito marrom. Outra característica notável do TAM é o leito capilar denso que fornece aos adipócitos substratos e oxigênio para oxidação e permite, assim, a distribuição eficiente de calor para o resto do corpo (21).

Além do adipócito marrom, outro tipo de adipócito com fenótipo termogênico foi identificado no tecido adiposo branco há muito tempo, mas apenas recentemente

este achado vem sendo mais valorizado e ficou caracterizado que se trata de um adipócito distinto, inclusive com origem embrionária diferente do adipócito marrom (22). Este adipócito, denominado de adipócito bege, e caracterizado como termogênico pela alta expressão da UCP1, é considerado um adipócito recrutável, essencial para termogênese e que, também, confere proteção contra obesidade e doença metabólicas (23, 24). O adipócito bege tem características semelhantes ao marrom, como quantidade aumentada de mitocôndria, gotículas de lipídeos multiloculares e expressão da UCP1 (Figura 1), e classicamente aparece no TAB em resposta ao frio ou à estimulação β 3-adrenérgica (25).

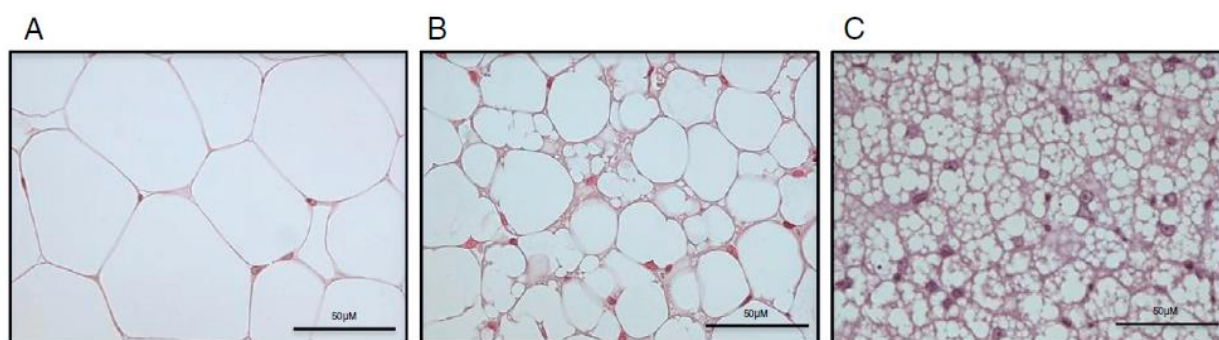


Figura 1 - Morfologia dos três tipos diferentes dos adipócitos.
Legenda: (A) adipócito branco; (B) adipócito bege; (C) adipócito marrom. Escala de barra 50 μ m.
Fonte: Adaptada de Keipert e Jastroch (25)

Os conhecimentos que se têm hoje a respeito da origem desses dois tipos celulares termogênicos são que os adipócitos marrons se originam de células precursoras do mesoderma paraxial, que expressam o marcador Myf5 (fator miogênico 5), que podem dar origem tanto ao adipócito marrom quanto ao músculo esquelético. O direcionamento ao adipócito marrom resultado da atividade da proteína PRDM16 (proteína dedo de zinco conhecida como domínio PR16). Os adipócitos brancos e bege, por sua vez, originam-se de células precursoras do mesoderma lateral que não expressam o marcador Myf5 e que costumam ocupar o estroma vascular do tecido adiposo, representando assim um *pool* contínuo de células para se diferenciarem em adipócitos bege ou brancos. Há evidências de que estes precursores já tenham comprometimento com a diferenciação em branco ou em bege, e como o adipócito bege aparece em algumas situações ele é considerado um tipo de adipócito recrutável e plástico, que pode assumir um fenótipo semelhante ao do adipócito branco, em situações em que não é recrutado, e fenótipo semelhante ao marrom, em situações em que é recrutado (26).

A caracterização do tecido adiposo termogênico no humano adulto aparentemente começou na tentativa de se reduzir o seu efeito de produzir artefato, a partir de um estudo relacionado à área de radiologia (27) que tinha a intenção de minimizar a captação do radiofármaco ^{18}F -desoxifluoroglicose (^{18}F -DFG) nos exames de avaliação de tumores por este tecido (tomografia computadorizada por emissão de pósitrons, PET-TC). Assim, a captação do radiofármaco pelo tecido adiposo termogênico representava um artefato nesses exames, desta forma a ideia dos autores era investigar formas diminuir a atividade deste tecido. Diante disso, ao que tudo indica o tecido adiposo termogênico no humano adulto foi descrito em 2004 e pouco depois foram observados estudos que investigaram o seu significado fisiológico.

Em 2007, um grupo de pesquisadores publicou uma revisão intitulada "Evidência inesperada de tecido adiposo marrom ativo em humanos adultos" (28), enfatizando o achado inesperado da presença do tecido adiposo termogênico no humano adulto. Neste trabalho (28), ficou bem caracterizada, por meio de imagens funcionais (PET-TC) de indivíduos saudáveis em ambiente frio ou quente, que havia aumento da captação de ^{18}F -DFG em resposta à exposição ao frio, sobretudo na região cervical. Este aumento, contudo, era suprimido pelo uso do propranolol, um bloqueador beta-adrenérgico, o que diferenciava o tecido de tecido tumoral.

Somente a partir de 2009 começaram a aparecer os primeiros indícios da importância fisiológica deste tecido para o adulto, a partir da publicação dos dados de três estudos, em um mesmo número de um importante periódico. O primeiro trabalho (29) avaliou dados retrospectivo de 3640 pacientes que tiveram imagem de PET-TC maiores que 4mm, com densidade de tecido adiposo e captação do radiofármaco (^{18}F -FDG) de até 2g/mL, para evitar a inclusão de imagens com características tumorais. Os autores observaram estes depósitos na região cervical anterior em 7,5% das mulheres e 3,1% dos homens, e verificaram que sua presença correlacionava-se negativamente com a idade, temperatura do ambiente, uso de bloqueadores beta-adrenérgicos e o índice de massa corporal (IMC). Os depósitos foram caracterizados como termogênicos (na ocasião, descritos como TAM) pela expressão da UCP1.

O outro trabalho (30) foi um ensaio clínico em que 24 indivíduos saudáveis foram expostos a termoneutralidade (22°C) ou ao frio (16°C) e logo em seguida submetidos ao PET-TC. Os pesquisadores observaram que os indivíduos, na

situação de frio, apresentaram uma área de intensa atividade metabólica que não foi observada na situação de termoneutralidade. Além disso, a quantidade de captação apresentou correlação negativa com o percentual de gordura e IMC, mas positiva com a taxa metabólica basal, sugerindo, assim, associação com a saúde metabólica.

O terceiro estudo (31) foi conduzido em 5 homens saudáveis que foram submetidos ao PET-TC em temperatura ambiente ou no frio; a exposição ao frio consistiu na permanência, durante 2 horas, em ambiente com temperatura de 17 a 19°C, seguida da imersão de um pé em água gelada, na temperatura de 5 a 9°C, durante a realização do PET-TC. Os autores observaram que os indivíduos em situação de frio apresentaram área de intensa atividade metabólica e com densidade de tecido adiposo, sugerindo a presença de tecido adiposo termogênico. O mesmo não foi observado em temperatura ambiente. A identidade do tecido como adiposo termogênico foi caracterizada pela expressão de transcritos e proteínas codificadas por genes marcadores da termogênese, incluindo UCP1, DIO2 (que codifica a desidrodinase tipo 2), PGC1 α , PRDM16 e ADR3 (que codifica o receptor beta-adrenérgico tipo 3).

Subsequentemente, um estudo em roedores adultos identificou o adipócito termogênico presente no TAB como um tipo celular distinto daquele presente no TAM, e o primeiro tipo celular ficou caracterizado como adipócito bege. Neste estudo, Wu et al (23) observaram que depósitos subcutâneos de TAB de camundongos 129SVE têm maior propensão para a expressão de UCP-1 e outros genes relacionados à termogênese, em comparação com os depósitos viscerais do TAB, sugerindo que adipócitos bege são recrutados preferencialmente neste depósito, nesta linhagem de camundongos. Além disso, este estudo mostrou que os adipócitos bege têm características de ambas as células adiposas, marrom e branca. No estado basal, adipócitos brancos e bege apresentam baixa expressão de genes termogênicos (*Ucp1*, *Cox7a1* e *Cidea*), quando comparados com os adipócitos marrons. Entretanto, após estimulação por AMPc (adenosina monofosfato cíclico), a expressão de UCP1 no adipócito bege atinge concentrações absolutas semelhantes às observadas no TAM. Esses dados sugeriram que o adipócito marrom expressa quantidades relativamente elevadas de UCP1 mesmo sob condições não estimuladas e que a capacidade dos adipócitos bege de expressar a UCP1 é dependente de algum fator indutor.

Neste mesmo estudo (23), o adipócito termogênico no TAB, denominado adipócito bege, ficou caracterizado como tipo celular único pela elevada expressão de um conjunto específico de genes, incluindo *Klh13*, *Cd40*, *Ear2*, *Tmem26*, *Cd137*, *Tbx1* e *Slc27a1* e baixa expressão de genes característicos do adipócito marrom, como *Eva1*, *Fbxo31*, *Pdk4*, *Acot2*, *Hspb7*, *Slc29a1* e *Oplah*. Adicionalmente, os pesquisadores observaram que os genes *Cd137*, *Tmem26* e *Tbx1* foram expressos também em depósitos de tecido adiposo termogênico em humanos adultos, em comparação com depósitos de TAB clássico, e que os genes característicos do TAM em roedores não foram expressos diferencialmente no TAB clássico e termogênico de humanos. Estes dados, em conjunto, sugerem que o tecido adiposo termogênico encontrado em humanos adultos se assemelha mais ao adipócito bege de roedores que ao TAM clássico.

Além disso, Sharp et al (32) estudaram camundongos C57BL/6 e observaram também assinatura gênica única para cada tipo de adipócito, marrom, bege ou branco. Os autores descreveram também que adipócitos marrons e bege expressam genes em comum, relacionados à sua capacidade termogênica, e que adipócitos brancos e bege expressam um conjunto semelhante de genes, em concordância com sua origem a partir do mesmo precursor (Tabela 1). Os autores investigaram a expressão destes conjuntos de genes, caracterizados em roedores, em células humanas, e identificaram o CITED1 como gene adicional seletivo do adipócito bege em camundongos e humanos.

Tabela 1 - Genes seletivos do adipócito branco, bege e marrom

	Genes
Seletivos do adipócito marrom	<i>Zic1</i> , <i>Lhx8</i> , <i>Epstl1</i>
Seletivos do adipócito bege	<i>Fgf21</i> , <i>Car4</i> e <i>Cited1</i>
Seletivo do adipócito branco	<i>Ang</i> , <i>Resistin</i> , <i>Wdnm1</i> e <i>Serpina3a</i>
Comuns aos adipócitos marrons e bege	<i>Ucp1</i> , <i>Cidea</i> , <i>Cox8b</i> e <i>Ppargc1a</i>
Comuns aos adipócitos brancos e bege	<i>Hox9a</i>

Fonte: Sharp et al (32).

Hoje o que se acredita é que o humano adulto apresenta um "gradiente de tecido adiposo" na região cervical, local onde se observa maior quantidade de tecido adiposo termogênico. Nas áreas mais profundas dessa região, é possível encontrar

adipócitos marrons genuínos, em áreas intermediárias, o adipócito bege e, naquelas mais superficiais, o adipócito branco. Vale ressaltar que os depósitos de tecido adiposo termogênico no humano adulto são constituídos em grande parte por adipócitos bege (33).

Estudos, também conduzidos em modelos murinos, estabeleceram o papel crítico do adipócito bege para saúde metabólica. Em estudo (24) clássico, foi observado que o nocaute seletivo da PRDM16 no tecido adiposo em camundongos resultou em predisposição a obesidade e resistência insulínica induzida por dieta hiperlipídica. Os autores observaram que a termogênese no TAM permaneceu inalterada nos animais, enquanto que no TAB subcutâneo foi observada redução da expressão de genes relacionados à termogênese e do consumo de oxigênio, tanto em estado basal como na situação estimulada pelo frio ou por agonista beta3-adrenérgico. Foi observado, ainda, aumento da expressão de genes seletivos de TAB visceral no TAB subcutâneo.

Desta forma, o adipócito bege pode ser utilizado como um alvo potencial terapêutico para tratamento de obesidade e doenças metabólicas, tanto em camundongos como em humanos. Muitos genes e vias que regulam a biologia de adipócitos marrons e bege já foram identificados, fornecendo uma variedade de alvos terapêuticos promissores para doenças metabólicas (12) (Figura 2).

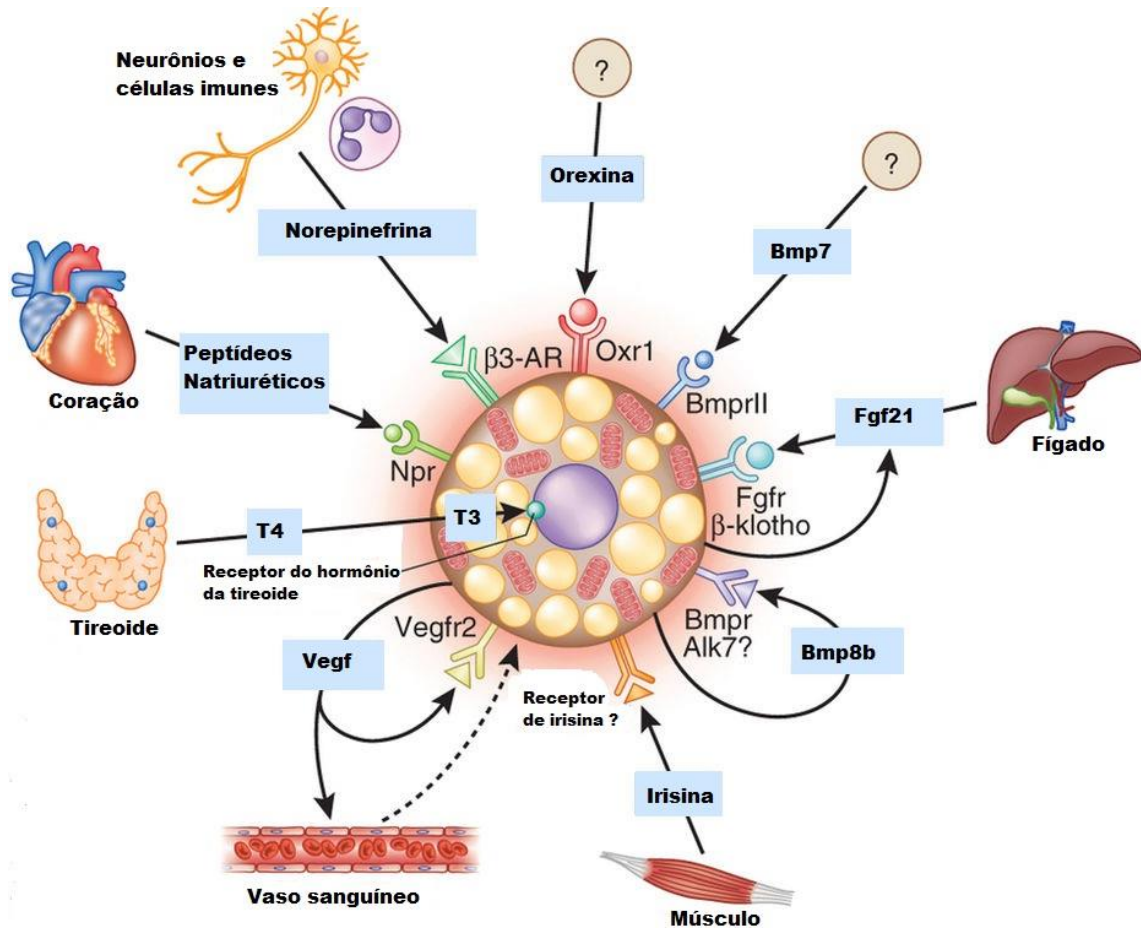


Figura 2 - Fatores que recrutam os adipócitos marrons, adipócitos bege ou ambos.

Legenda: Fgf21: fator de crescimento de fibroblasto 21; T4: tiroxina; T3: triiodotironina; Bmp8b: proteína morfogenética óssea 8b; Vegf: fator de crescimento endotelial vascular; Bmp7: proteína morfogenética óssea 7. Fonte: Harms e Seale (12)

Considerando-se os conhecimentos a respeito da atividade do adipócito termogênico, acredita-se que o aumento da quantidade e/ou atividade do tecido adiposo termogênico, TAM ou TAB amarronzado (adipócitos bege) leva ao aumento do gasto energético e isto explica o efeito favorável na prevenção e tratamento da obesidade, pelo menos em roedores. Por este mesmo mecanismo, haveria efeito benéfico sobre o metabolismo da glicose e lipídeos, independentemente do efeito sobre o peso corporal (9) (Figura 3). Com isso, a identificação de tecido adiposo termogênico em humanos adultos e do seu potencial antiobesidade tem estimulado pesquisas que visam definir estratégias para aumentar sua quantidade e/ou estimular sua atividade.

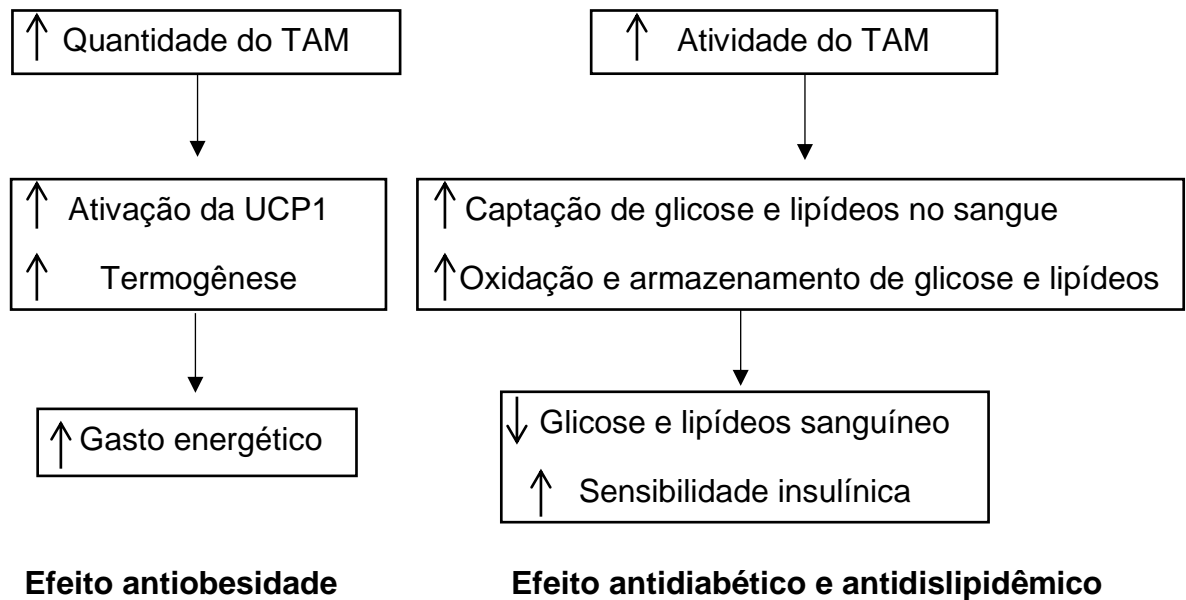


Figura 3 - Tecido adiposo termogênico no tratamento da obesidade e desordens metabólicas associadas.

O aumento da quantidade e/ou atividade do tecido adiposo termogênico conduz a aumento da atividade da UCP1 e, assim, a termogênese e aumento do gasto energético, que pode ter efeito antiobesidade. Neste processo, o tecido adiposo termogênico também aumenta a captação de ácidos graxos e glicose circulantes. Isso resulta na diminuição da concentração sanguínea de glicose e ácidos graxos, que resulta em efeitos antidiabético e antidislipidêmico. TAM: tecido adiposo marrom. Fonte: Adaptado por Kim e Plutzky (9).

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL E METABOLISMO ENERGÉTICO

A terminologia “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, estes organismos apresentam cerca de 3,3 milhões de genes, o que corresponde a 150 vezes o número de genes do genoma humano (34).

A microbiota intestinal de adultos é dominada por dois filos, Firmicutes e Bacteroidetes, que compreendem cerca de 90% de todas as espécies de bactérias no intestino. As outras divisões principais incluem o Proteobacteria e Actinobacteria, e um número menor de Fusobacteria e Verrucomicrobia (35). 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 microorganismos 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, que chega a 10^{11} unidades formadoras de colônia (UFC)/mL no cólon (36) (Figura 4).

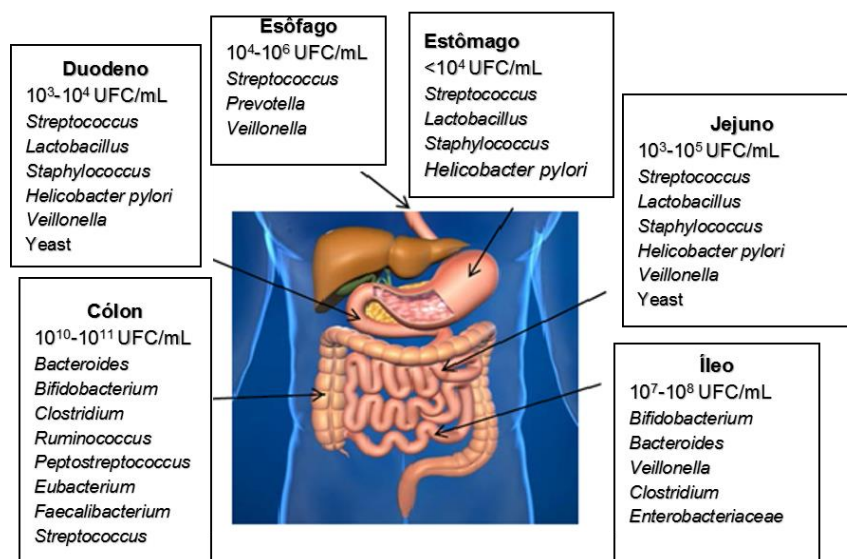


Figura 4 - Distribuição e composição das espécies de bactérias no trato gastrointestinal. UFC: unidade formadora de colônia. Fonte: Adaptada de Dueñas et al (36).

Existem vários fatores que influenciam a composição e a função da microbiota intestinal, do nascimento à vida adulta. Dentre eles, está o tipo de parto, uma vez que são observadas diferenças na composição da microbiota intestinal de crianças que nasceram de parto cesáreo quando comparadas às que nasceram de parto vaginal (37). Há, ainda, transferência da microbiota da mãe para seus bebês por meio da amamentação, o que em geral apresenta resultado positivo no crescimento e desenvolvimento infantil; entretanto, o leite de mães obesas tem bactérias diferentes e menos diversas que o leite de mães eutróficas (38).

A dieta também parece ser um dos fatores modificadores da composição da microbiota intestinal mais importantes. Em camundongos, a dieta hiperlipídica (60% de gordura) diminui o número e a diversidade bacteriana da microbiota intestinal quando comparada com dieta normolipídica (39, 40). Além disso, a microbiota intestinal apresenta capacidade de se alterar e remodelar rapidamente sua composição como resultado da variação da dieta.

Destaca-se que a dieta hiperlipídica, além de alterar a composição da microbiota intestinal, ela promove também aumento da absorção de lipopolissacarídeo (LPS). Estudo realizado por Cani et al (41) mostrou que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica tinham aumento nas concentrações de plasmática de LPS, devido ao aumento da permeabilidade intestinal a esta molécula. A absorção de LPS, por sua vez, pode estimular a secreção de proteínas pró-inflamatórias, resultando em inflamação sistêmica de baixo grau, de forma que a microbiota intestinal parece ter papel ativo na promoção e/ou inibição da inflamação (42).

Adicionalmente, os antibióticos também afetam a microbiota intestinal, e a alteração da composição da microbiota intestinal depende da classe do antibiótico, dose e período de exposição, existindo também diferenças relacionadas à sua ação farmacológica ou bactérias alvo (43). Em estudo realizado com homens obesos (44), foi observado que a administração de 500 mg de vancomicina por 7 dias reduziu a concentração das bactérias gram-positivas, principalmente as bactérias pertencentes ao filo Firmicutes. Houve, ainda, aumento compensatório das bactérias gram-negativas pertencentes ao filo Proteobacteria. Em outro estudo, envolvendo sujeitos internados em uma Unidade Terapia Intensiva, observou-se que o tratamento com ciprofloxacina, na dose de 500 mg duas vezes por dia, reduziu as concentrações de bactérias pertencentes aos filios Firmicutes e Actinobacteria e aumentou a do filo Bacteroidetes (45).

Por fim, a composição e função da microbiota intestinal podem ser influenciadas por algumas disfunções metabólicas, como a obesidade, hábitos de higiene, estilo de vida, inflamação crônica, estresse e consumo de álcool (46). Essas modificações da microbiota intestinal ocasionadas por esses fatores são caracterizadas como disbiose intestinal. A disbiose é um estado em que a microbiota intestinal produz efeitos prejudiciais ao hospedeiro por mudanças qualitativas e quantitativas das bactérias que a compõem, mudanças nas atividades metabólicas que desempenha e mudanças na distribuição das bactérias ao longo do trato digestivo (47).

A microbiota intestinal desempenha várias funções importantes no 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, além de manutenção da estrutura e função do trato gastrointestinal (48).

Dentre estas várias funções, destaca-se a fermentação dos carboidratos. Os carboidratos não digeríveis, como celulose, xilanas, amido resistente e inulina, são fermentados no cólon pela microbiota para produzir energia para o crescimento microbiano e produção de produtos finais como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato. Os AGCC são substratos de energia para o epitélio do colón (butirato) e tecidos periféricos (acetato e propionato). Os tipos e quantidades de AGCC produzidos são determinados pela quantidade de carboidrato que é consumido e pela composição da microbiota intestinal (49).

Os AGCC ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCR). O GPCR41, também denominado receptor de ácidos graxos livres 3, é ativado igualmente pelo propionato e butirato e é expresso no intestino, adipócitos e sistema nervoso periférico. Outro receptor, GPCR43, também denominado receptor de ácidos graxos livres 2, é mais responsivo ao propionato e acetato que ao butirato e expresso no intestino e tecido adiposo (50).

Estudos anteriores mostraram a importância destes receptores de AGCC para a homeostase metabólica. Camundongos deficientes do receptor GPR43 são obesos quando alimentados com dieta normolipídica, enquanto que camundongos que superexpressam o GPR43 seletivamente no tecido adiposo permanecem magros mesmo quando alimentados com dieta hiperlipídica. Neste mesmo estudo, foi observado que a ativação do GPR43 pelo AGCC no tecido adiposo suprime a sinalização de insulina, diminui o armazenamento de lipídios no tecido adiposo e aumenta a oxidação de lipídios em outros tecidos, resultando em aumento do gasto energético (51). Em outro estudo, Samuel e colaboradores (52) mostraram que camundongos que não expressavam o GPR41 apresentaram menor peso corporal quando comparados com os camundongos que expressavam esse receptor. Entretanto, essa diferença de peso não foi observada quando os camundongos foram mantidos em condições *germ-free* (isentos de germes), sugerindo a importância microbiota intestinal na geração de AGCC e ativação do GPR41 e, assim, na regulação da homeostase metabólica pela sinalização por este receptor.

Cada AGCC apresenta efeitos distintos sobre peptídeos intestinais e homeostase energética. Como exemplo, o acetato está relacionado com aumento da

liberação de leptina pelos adipócitos, enquanto que o butirato e propionato aumentam a secreção do peptídeo tirosina tirosina (PYY) e peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP1) no epitélio intestinal. O butirato e acetato têm sido descritos como fatores protetores contra a obesidade induzida por dieta, enquanto o propionato é descrito como fator indutor da redução da ingestão de alimentos (51, 53, 54).

O papel da microbiota sobre o metabolismo energético, por meio da produção dos AGCC e de outros mecanismos, é definido a partir de estudos envolvendo a avaliação da microbiota intestinal em cenários de diferentes exposições dietéticas ou suplementações de prebióticos e probióticos e dos efeitos destes cenários sobre a homeostase metabólica. Entretanto, o modelo mais frequentemente utilizado e aceito para estabelecer a relação causal entre a microbiota e a homeostase metabólica, é o de colonização de camundongos *germ-free* com microbiotas de diferentes composições e a observação do fenótipo metabólico destes animais (55).

Backhed et al (5) observaram que camundongos *germ-free* apresentavam cerca de 40% menos gordura corporal total quando comparados com camundongos com microbiota intestinal convencional (animais que possuem microbiota intestinal considerada não disbiótica), mesmo com a constatação de que os últimos camundongos ingeriram 30% menos de energia quando comparados com os camundongos *germ-free*. Adicionalmente, os pesquisadores colonizaram animais *germ-free* com a microbiota dos animais convencionais e observaram aumento de 60% da gordura corporal, apesar da ingestão alimentar ser significativamente inferior.

Cabe destacar que alguns mecanismos potencialmente influenciados pela microbiota intestinal já foram identificados para explicar a resistência ao ganho de peso caracteristicamente apresentada por animais *germ-free*, quando comparados com animais colonizados e saudáveis. Entre eles, estão o aumento da expressão da proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) no epitélio do cólon, como também ao aumento expressão da AMPK no fígado, provavelmente promovendo a diminuição da lipogênese hepática *de novo*. Além disso, os camundongos *germ-free* exibem aumento da expressão do fator de adipócitos induzido por jejum (FIAF), fator que regula negativamente a adiposidade (56).

A associação entre a composição da microbiota intestinal e o peso corporal em modelos de doenças também é observada por estudos diferentes abordagens de

investigação, entre elas a de suplementação de probióticos. Lee et al (6) observaram que camundongos que receberam suplementação com *Lactobacillus spp.* apresentaram redução do peso e gordura corporal, embora não tenha sido observada mudança do consumo alimentar. Esses dados sugeriram o importante papel que a microbiota intestinal desempenharia na captação de calorias da dieta e, assim, na determinação da eficiência calórica.

Dados de estudos envolvendo roedores e humanos sugerem que a obesidade altera a natureza da microbiota intestinal. Em estudo realizado por Ley et al (57), foi observado que camundongos geneticamente obesos *ob/ob* (deleção do gene que codifica a leptina) tiveram redução de 50% da concentração do filo Bacteroidetes e aumento da concentração do filo Firmicutes. Além disso, Ley et al (3) compararam a microbiota intestinal de humanos obesos que foram randomizados para receber dietas com restrição de lipídeos ou dietas com restrição de carboidratos. Antes da intervenção, os indivíduos obesos tinham menor concentração de Bacteroidetes e maior concentração de Firmicutes, em comparação com indivíduos magros (grupo controle). Ao longo da intervenção, a concentração de Bacteroidetes aumentou e a de Firmicutes diminuiu, independentemente da intervenção, e o aumento da concentração de Bacteroidetes correlacionou-se com a perda de peso e não com a mudança do conteúdo calórico da dieta ao longo do tempo.

Visto isso, é interessante notar que ambas as estratégias para o tratamento da obesidade, restrição calórica e cirurgia bariátrica, estão associadas a redução da razão Firmicutes/Bacteroidetes via aumento da concentração de Bacteroidetes (3, 58). Com base nessa observação, sugere-se que a microbiota intestinal do indivíduo obeso é rica em espécies que expressam genes relacionados a vias metabólicas altamente eficientes na captação de energia e que, assim, podem promover armazenamento de gordura (35).

A concentração de Bacteroidetes na microbiota intestinal tem sido associada positivamente com as concentrações circulantes de propionato, butirato e acetato, no hospedeiro. Destaca-se, ainda, que as mesmas espécies de bactérias que são diminuídas nos indivíduos obesos e aumentadas em resposta à perda de peso são também correlacionadas com mudanças nos AGCC que podem favorecer a diminuição de peso e a manutenção da redução do peso corporal (59).

Outro mecanismo envolvido na relação entre a microbiota intestinal e a homeostase energética é a sinalização da leptina. Estudo realizado por Schele et al

(60) mostrou que a colonização de camundongos *germ-free* com a microbiota de camundongos convencionais atenuou significativamente a perda de peso e a diminuição da expressão do peptídeo relacionado ao gene agouti e neuropeptídeo Y, após a administração da leptina, sugerindo que a colonização, em comparação com o cenário livre de germes, resulte em resistência à ação da leptina. Além disso, no estudo realizado por Everard et al (61), foi mostrado que a administração crônica de prebióticos a camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica modificou a composição da microbiota intestinal (diminuiu a concentração de Firmicutes e aumentou a concentração de Bacteroidetes) e aumentou a sensibilidade à leptina, o que corrobora com os dados prévios de que microbiota intestinal afeta a sinalização da leptina.

Por outro lado, a redução da expressão de FIAF, induzida pela microbiota intestinal, também é um mecanismo que tem sido postulado para explicar a associação entre microbiota intestinal e metabolismo energético. Backhed et al (62) mostraram que camundongos *germ-free* que foram colonizados com a espécie *Bacteroides thetaiotaomicron* apresentaram aumento da gordura corporal, decorrente da supressão do FIAF. Neste mesmo estudo, foi observado que camundongos *germ-free* com deleção do gene que codifica o FIAF apresentaram maior suscetibilidade a obesidade induzida por dieta, que foi em parte atribuída a menor expressão do receptor alfa ativado pelo proliferador de peroxissoma, um receptor nuclear que regula positivamente a expressão dos genes relacionados à oxidação dos ácidos graxos (Figura 5).

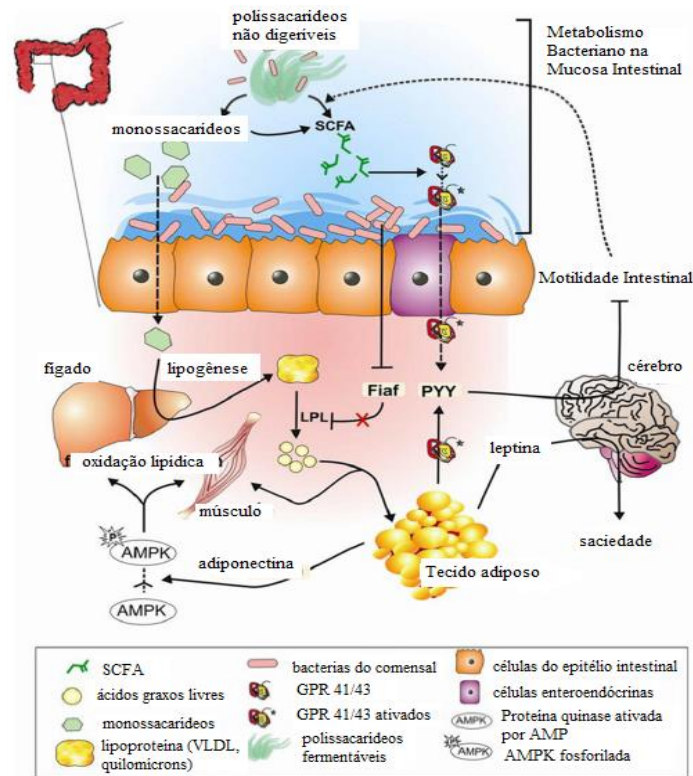


Figura 5 - Microbiota intestinal e regulação da homeostase de energia.

Ao degradar polissacarídeos não digeríveis, os micro-organismos do intestino produzem monossacarídeos e SCFA. Os SCFA, por sua vez, ligam-se aos receptores GPR 41/43 e estimulam a produção de PYY, o que inibe a motilidade intestinal e permite que as bactérias do intestino possam digerir mais polissacarídeos. As bactérias intestinais também regulam o metabolismo energético reduzindo a expressão do FIAF por células epiteliais do intestino. O FIAF suprime a degradação de lipoproteínas e a deposição de SCFA no tecido adiposo. A deposição de lipídeos no músculo esquelético e no fígado também é regulada por micro-organismos através de mudanças na atividade da AMPK. AMPK, proteína ativada por adenosina monofosfato; SCFA, ácido graxos de cadeia curta; GPR 41/43, receptores acoplados a proteína G41/43; PYY, peptídeo tirosina tirosina; FIAF, fator de adipócito induzido por jejum; LPL, lipoproteína lipase; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade. Fonte: Adaptado por Krajalnik-Brown et al (63)

Os ácidos biliares que são metabolizados pela microbiota intestinal também desempenham um papel importante no metabolismo energético por meio da sinalização pelo receptor de ácido biliar (RAB). Estudo realizado por Parseus et al (64) demonstrou que camundongos selvagens (com microbiota intestinal) desenvolveram obesidade induzida por dieta, inflamação do tecido adiposo e esteatose hepática quando alimentados com dieta hiperlipídica, enquanto que, os camundongos selvagens que tinham deleção do gene RAB e os camundongos *germ-free* não desenvolveram esse fenótipo. Além disso, os pesquisadores observaram que a sinalização pelo RAB muda a composição da microbiota intestinal quando camundongos *germ-free* são colonizados com o conteúdo cecal de camundongos selvagens alimentados com dieta hiperlipídica, uma vez que

observaram que animais *germ-free* apresentaram aumento de peso maior quando comparado com os animais *germ-free* que foram colonizados com conteúdo cecal de camundongos que tinham deleção do gene RAB.

De acordo com o exposto, observam-se os diversos mecanismos, já identificados, que explicam a influência da microbiota intestinal sobre o metabolismo energético. Em humanos, há diversos estudos de associação que sugerem o papel da microbiota na obesidade, embora nesta espécie haja menos estudos para comprovar a relação causal.

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL E GASTO ENERGÉTICO

Os mecanismos que controlam o peso corporal não são compreendidos por completo, mas o excesso de gordura corporal é provavelmente precedido e mantido por um desequilíbrio crônico entre a ingestão de energia e o gasto de energia, decorrente da complexa interação de fatores genéticos, ambientais e comportamentais (65). Dessa forma, a gordura corporal, o consumo alimentar, e o gasto energético são homeostaticamente regulados e o mau funcionamento desse balanço pode resultar em obesidade (66).

Um dos componentes do gasto energético é a termogênese não relacionada a tremores, termogênese adaptativa, resultante da atividade do tecido adiposo termogênico. A manutenção da temperatura corporal durante a exposição crônica ao frio requer a ativação deste tecido, que, por sua vez, depende de energia proveniente da oxidação de substratos provenientes tanto da ingestão de alimentos, como da oxidação de reservas de substratos. Esta última ocorre preferencialmente em indivíduos obesos, enquanto a dependência de substratos provenientes da alimentação ocorre em indivíduos com baixo peso e eutróficos (67).

O frio estimula o sistema nervoso simpático a induzir os mecanismos termogênicos por meio da ativação direta da via PKA (proteína quinase A), após ativação de receptores adrenérgicos em adipócitos (68). No entanto, também há evidências de mecanismos que atuam independentemente da sinalização adrenérgica, para aumentar a potencialidade do tecido adiposo termogênico, como por exemplo o hormônio tireoidiano (69). A estimulação do receptor β 3-adrenérgico (ADR3), por meio da exposição ao frio ou a agentes farmacológicos, tem efeitos

agudos e crônicos sobre o tecido adiposo termogênico (Figura 6). Além disso, esse receptor é expresso abundantemente e predominantemente em adipócitos termogênicos (marrons e bege), o que motivou a síntese de agonistas seletivos do ADR3 (70).

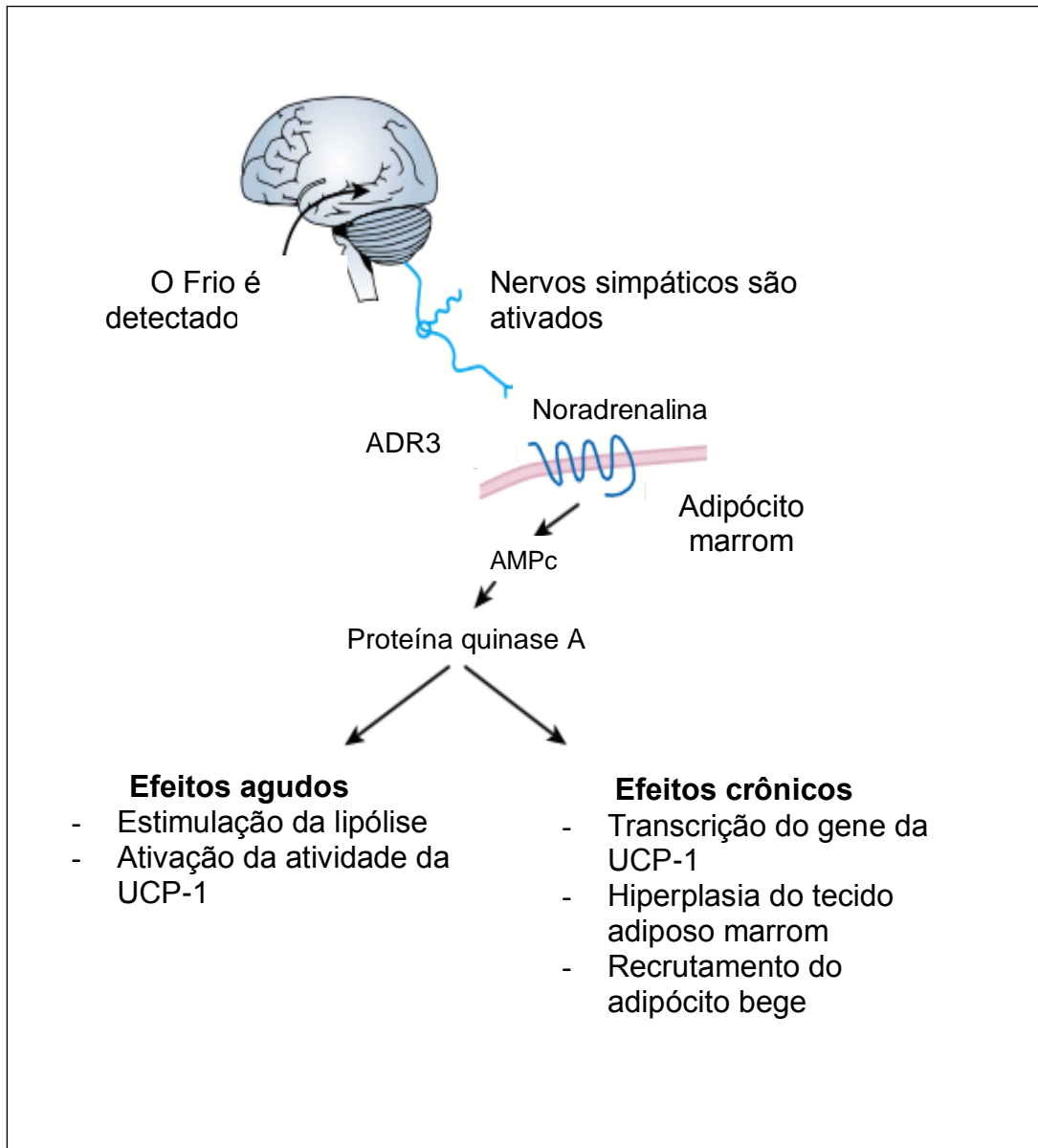


Figura 6 - Mecanismo da termogênese adaptativa induzida pelo frio. ADR3: receptor adregérgico 3, AMPc: Adenosina monofosfato cíclico. UCP-1: proteína desacopladora 1. Fonte: Adaptada por Lowell e Spiegelman (70)

Estudo realizado por Susulic et al (71) demonstrou que camundongos tratados com CL316,243, agonista do ADR3, apresentaram aumento do gasto energético e redução da ingestão alimentar, entretanto esses efeitos estavam completamente ausentes em camundongos deficientes do ADR3. Estes dados sugeriram, assim, que o ADR3 desempenha um papel importante na regulação do

balanço energético e que a ação do agonista CL316,243 é mediada exclusivamente pelo ARD3.

No estudo de Himms-Hagen et al (72), foi observado que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica que receberam o CL316,243 apresentaram aumento da temperatura corporal, do gasto energético e redução da gordura corporal, entretanto a ingestão alimentar não foi modificada, mas houve uma prevenção do desenvolvimento da obesidade induzida pela dieta. Os autores também observaram que o TAM dos camundongos apresentou hipertrofia, com aumento da expressão da UCP-1.

Além da sinalização β 3-adrenérgica, os hormônios tireoidianos também contribuem para a termogênese adaptativa no tecido adiposo termogênico. A sinalização pela norepinefrina aumenta o conteúdo intracelular de AMPc no adipócito, que rapidamente ativa a lipólise e induz ativação da desidrodinase tipo 2 (D2). A lipólise resulta em fornecimento de substratos para a produção de calor, ao passo que a ativação da D2 promove aumento da conversão intracelular da tiroxina (T4) em 3,3,5-triiodotironina (T3). O T3, por sua vez, regula diretamente a expressão do gene que codifica a UCP1, por meio da ativação do receptor beta de hormônio tireoidiano ($TR\beta$). O TAM, especificamente, expressa altos níveis de receptores alfa e beta hormônio tireoidiano ($TR\alpha$ e $TR\beta$) (73-75).

Dados de alguns estudos indicam que a ativação $TR\beta$ pode representar uma estratégia alternativa para aumentar a termogênese no TAM, como também promover o amarronzamento do TAB. Estudo realizado por Amorim et al (76) mostrou que ratos alimentados com dieta hiperlipídica e que receberam GC-24 (agonista do $TR\beta$) apresentaram aumento do gasto energético, melhora da sensibilidade à insulina e diminuição da concentração sérica triglicérides. Villicev et al (77), por sua vez, mostraram que o tratamento de ratas com T3 ou GC-1 (agonista do $TR\beta$) não tiveram influência sobre o peso corporal, embora o tratamento com T3 tenha aumentado a ingestão alimentar. Além disso, o consumo de oxigênio ou gasto energético foi significativamente e igualmente aumentado nos grupos que receberam T3 ou GC-1, e ambos os grupos apresentaram diminuição da massa gordurosa, embora a diminuição em resposta ao T3 tenha sido superior.

Ribeiro et al (78) investigaram camundongos com mutação do $TR\beta$ (mutante PV, caracterizado por redução da afinidade pelo T3) e camundongos selvagens, em que foi induzido hipotireoidismo e iniciado tratamento com T3 obtenção de

concentração sérica de hormônio semelhante nos dois grupos. Os autores observaram que a expressão da UCP1 no TAM foi significativamente menor nos camundongos mutantes, sugerindo, portanto que o TR β medeia a regulação da expressão da UCP1 no TAM em resposta ao T3. Lin et al (79), por sua vez, observaram que animais tratados com GC-1 apresentaram aumento da expressão da UCP-1 no TAB inguinal, sugerindo que a ativação do TR β promove o amarronzamento no TAB. Este processo foi acompanhado melhora da tolerância ao frio, confirmando o papel do TR β na termogênese adaptativa.

Como descrito anteriormente, a microbiota intestinal é identificada como importante regulador do metabolismo e desempenha papel relevante no desenvolvimento e progressão da obesidade. Entre os mecanismos propostos para explicar a regulação do metabolismo energético do hospedeiro pela microbiota intestinal, inclui-se sua influência sobre o gasto energético. De fato, muitos estudos sugerem a influência da microbiota sobre o gasto energético, seja por mostrar seus efeitos sobre o peso independentemente da ingestão de energia, seja por mostrar seus efeitos sobre o consumo de oxigênio.

No estudo realizado por Lee et al (6), camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e que receberam suplementação com *Lactobaccillus* apresentaram redução do peso e gordura corporal sem mudanças no consumo energético. No estudo de Backhed et al (5), camundongos *germ-free* colonizados com a microbiota intestinal de camundongos magros apresentaram ganho de peso, apesar de redução do consumo de energia (avaliado somente pelo consumo da dieta) e aumento do gasto energético. No estudo de Kubeck et al (80), foi observado que camundongos *germ-free* alimentados com dieta hiperlipídica não desenvolviam obesidade, o que foi atribuído ao aumento do gasto energético, oxidação de carboidratos e da excreção de gordura e energia fecal apresentado por estes animais. Gao et al (81), por sua vez, observaram que camundongos que receberam dieta rica em lipídios suplementada com butirato de sódio (produto da fermentação microbiana) apresentaram redução do peso corporal, atribuída a aumento da oxidação de gordura e do gasto de energia.

Adicionalmente, estudos realizados em humanos demonstram a associação da microbiota intestinal com o gasto energético. No estudo realizado por Kocelak et al (82), em indivíduos obesos, foi observado que a população do filo *Firmicutes* foi correlacionada positivamente com a massa de gordura e negativamente com o gasto

energético de repouso e com o consumo máximo de oxigênio. No estudo realizado por Canfora et al. (83), também em indivíduos obesos, não foi possível observar mudança no gasto energético, na oxidação de gordura e na composição corporal quando estes indivíduos receberam suplementação de galacto-oligosacarídeos (modulador da microbiota intestinal). Já o estudo de Chambers et al (84), realizado em indivíduos saudáveis que receberam a suplementação aguda de propionato de sódio (produto da fermentação microbiana), observou-se aumento do gasto energético e da oxidação de lipídeos.

Assim como a obesidade e a composição da dieta alteram a composição da microbiota intestinal de uma maneira que afeta o metabolismo, é provável que as demandas de gasto energético em resposta à exposição ao frio possivelmente causem mudanças adaptativas na microbiota intestinal e, assim, diminuam a eficiência calórica, ou seja, a razão entre o consumo de energia e o ganho de peso (85). Entretanto, os mecanismos envolvidos na associação entre microbiota intestinal e a termogênese no tecido adiposo não estão totalmente esclarecidos.

Zietak et al (86) observaram que animais alimentados com dieta hiperlipídica e expostos ao frio (12°C) apresentaram alteração da composição da microbiota intestinal. Esta alteração, por sua vez, associou-se a aumento da expressão de marcadores específicos de termogênese no TAM (*Ucp1*, *Adrb3*, *Pgc1a*), aumento da produção de ácidos biliares conjugados, como a taurina, que inibiram a sinalização pelo FXR (receptor farnesoide X). Isto, por sua vez, resultou em ativação da via da AMPK para aumentar o gasto energético total. Os pesquisadores também observaram que a obesidade, nestes camundongos, foi significativamente reduzida após 4 semanas de exposição a 12°C, efeito este associado com o aumento da expressão de *Ucp1* no TAM e do gasto energético total. Além disso, o transplante da microbiota intestinal de camundongos expostos ao frio para camundongos *germ-free* manteve o fenótipo magro, além de promover a indução significativa de termogênese no TAM e com aumento da expressão da UCP1 no TAB inguinal (recrutamento do adipócito bege), porém em menor proporção que no TAM.

Entretanto no estudo de Chevalier et al (11), por sua vez, mostraram 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 *germ-free* 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 *germ-free* 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 *germ-free* 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.

Suárez-Zamorano et al (10) demonstraram que a ausência da microbiota intestinal, em camundongos *germ-free*, ou sua depleção, em camundongos alimentados com dieta normolipídica e tratados com antibióticos de amplo espectro, aumentou a sensibilidade à insulina no TAB subcutâneo e visceral, e que esses efeitos não se modificaram após 12h de exposição ao frio. Estes mesmos resultados foram observados em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou geneticamente obesos. Nos animais alimentados com dieta normolipídica e tratados com antibióticos, 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, este fenótipo foi transferido para camundongos *germ-free*, a partir de sua colonização com a microbiota residual de camundongos tratados com antibióticos.

Suárez-Zamorano et al (10) também exploraram o possível mecanismo pelo qual o tratamento com antibióticos de amplo espectro induziria o recrutamento das células bege. Observaram aumento expressão das citocinas do tipo 2 no TAB, mas não no TAM interescapular ou no intestino. Estas citocinas, por sua vez, são implicadas no recrutamento dos macrófagos M2, que secretam a epinefrina, um estímulo ao recrutamento do adipócito bege. Embora os autores não tenham avaliado a composição da microbiota intestinal neste estudo, estes dados sugerem, além do possível efeito da microbiota sobre o gasto energético, independentemente do cenário de dieta normo ou hiperlipídica, ou obesidade de origem genética). Sugerem, também, que algumas bactérias da microbiota intestinal, depletadas em resposta ao tratamento com o antibiótico, possam inibir o recrutamento de células beges, ou que bactérias cuja representação aumenta em resposta ao tratamento com antibióticos possam induzir seu recrutamento. Cabe destacar, entretanto, que os autores não exploraram possíveis efeitos diretos dos antibióticos sobre o recrutamento deste tipo celular.

Os resultados do estudo de Chevalier et al (11) podem parecer contraditórios com os de Suárez-Zamorano et al (10), uma vez que a depleção da microbiota intestinal por antibióticos não modificou o recrutamento do adipócito bege em resposta ao frio no último estudo, ao passo que no primeiro a microbiota intestinal, modificada pelo frio, foi essencial ao aumento da termogênese adaptativa. Embora seja necessário considerar o diferente desenho destes dois estudos (animais tratados com antibiótico vs. animais expostos ao frio, tempo de exposição ao frio, entre outros) como possível explicação para esta aparente contradição, a correlação entre a microbiota intestinal e o amarronzamento do TAB parece não estar completamente definida, nem os possíveis mecanismos envolvidos

Considerando que a resposta ao frio, como descrito anteriormente, envolve a ativação do sistema nervoso simpático e sinalização pelas catecolaminas, e também ativação do eixo tireotrófico e da ação intracelular do hormônio tireoidiano no tecido adiposo (68, 69), o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre o efeito individual dos dois principais componentes da resposta ao frio, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da modulação da microbiota intestinal sobre a ação da estimulação beta 3-adrenérgica e da triiodotironina no tecido adiposo, em camundongos C57Bl/6.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito da modulação da microbiota intestinal por antibióticos, em camundongos machos alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica, tratados com agonista do receptor β 3-adrenérgico ou triiodotironina, sobre:

- ✓ Massa corporal, ingestão de energia e eficiência calórica.
- ✓ Massa dos depósitos de tecido adiposo marrom (interescapular) e branco (inguinal, epididimal e retroperitoneal).
- ✓ Concentração sérica do hormônio estimulante da tireoide (TSH).
- ✓ Atividade da D2 no tecido adiposo branco subcutâneo axilar.
- ✓ Expressão de genes relacionados à termogênese (*Ucp1*, *Ppargc1a* e *Prdm16*) e genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano (*Dio2*, *Thra*, *Thrb* e *Scl16a2*) no tecido adiposo branco subcutâneo e visceral.

4 MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os animais utilizados nesse estudo foram camundongos machos da linhagem C57Bl/6, isogênicos, livres de patógenos específicos (ou *specific pathogen free*, SPF), ou seja, com microbiota intestinal composta apenas por micro-organismos não patogênicos. Esses animais foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), mediante laudo técnico que atestou sua qualidade sanitária (análise bacteriológica, bioquímica, hematológica e parasitológica) e controle genético (teste de genotipagem).

Após sua chegada ao biotério da Faculdade de Medicina da UnB, os camundongos foram mantidos em gaiolas de plástico (mini-isoladores da marca Alesco®), em grupos de 5 animais por gaiola, em ambiente com temperatura controlada (25^oC) e ciclo claro/escuro de 12 horas cada (escuro entre 18h00 e 6h00). Os animais chegaram ao Biotério da UnB na 4^o semana de vida e passam por um período de adaptação, de cerca de 1 semana, ao novo ambiente antes de sua utilização.

Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (com número de protocolo n^o 3/2017 - Anexo A).

4.1.1 Grupos experimentais

Os camundongos foram alimentados com dieta normolipídica (64,0% de carboidratos, 20,3% de proteínas e 15,8% de lipídeos) ou hiperlipídica (27,6% de carboidratos, 15,2% de proteínas, 57,2% de lipídeos), fornecida na forma de *pellet* e obtida da empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências® (Tabela 2). O fornecimento de dieta e de água potável (filtrada) foi *ad libitum*.

Tabela 2 – Composição das dietas.

Ingrediente	Normolipídica		Hiperlipídica	
	Kcal	%kcal	kcal	%kcal
Amido de milho	1590	39,8	638	11,9
Caseína	800	20	800	15
Amido Dextrinizado	528	13,2	400	7,5
Sacarose	400	10	400	7,5
Óleo de soja	630	15,8	360	6,7
Mix Vitaminas AIN 93	40	1	40	0,7
L-cistina	12	0,3	12	0,2
Banha	0	0	2700	50,5
Total	4000	100	5350	100

Valores referentes a 1kg de dieta. Fonte: PRAGSOLUÇÕES Biociências®

Na 5ª semana de vida, os animais foram divididos aleatoriamente, por sorteio, nos dois cenários de dieta, normolipídica ou hiperlipídica, compondo seis grupos para cada cenário, cada grupo contendo 5 animais, assim designados:

(G1) Animais que receberam somente dieta normolipídica ou hiperlipídica (n=5). Representaram o controle que permitiu avaliar os efeitos do uso dos antibióticos, do agonista β 3-adrenérgico ou do T3 sobre os desfechos do estudo.

(G2) Animais que receberam dieta normolipídica ou hiperlipídica e agonista β 3-adrenérgico (n=5). Representaram o grupo que permitiu avaliar o efeito do agonista β 3-adrenérgico sobre os desfechos do estudo.

(G3) Animais que receberam dieta normolipídica ou hiperlipídica e antibióticos (n=5). Representaram o grupo que permitiu avaliar o efeito do antibiótico, ou seja, da modulação da microbiota intestinal, sobre os desfechos do estudo.

(G4) Animais que receberam dieta normolipídica ou hiperlipídica, antibióticos e agonista β 3-adrenérgico (n=5). Representaram o grupo que permitiu avaliar o efeito

do agonista β 3-adrenérgico, no cenário de modulação da microbiota intestinal, sobre os desfechos do estudo.

(G5) Animais que receberam dieta normolipídica ou hiperlipídica e triiodotironina (T3) (n=5). Representaram o grupo que permitiu avaliar o efeito do T3 sobre os desfechos do estudo.

(G6) Animais que receberam dieta normolipídica ou hiperlipídica, antibióticos e triiodotironina (T3). Representaram o grupo que permitiu avaliar o efeito do T3, no cenário de modulação da microbiota intestinal, sobre os desfechos do estudo.

4.1.2 Tratamento com antibiótico, agonista do receptor β 3-adrenérgico e hormônio triiodotironina (T3)

Na 9ª semana de vida, os animais de cada grupo experimental foram individualizados. A modulação da microbiota intestinal por meio do uso de antibióticos foi realizada durante o período da 10ª à 15ª semanas de vida (5 semanas) e os animais receberam antibióticos na água de beber. Os antibióticos utilizados foram vancomicina (0,5 g/L) e ciprofloxacina (0,2 g/L), e o esquema de administração foi baseado em dados do estudo prévio de Suez et al (87). Ambos os antibióticos foram diluídos na água filtrada e para a completa diluição da ciprofloxacina foi necessário acrescentar 280 μ L/L de ácido acético glacial. A troca dos bebedouros (soluções de antibiótico) aconteceu duas vezes por semana (88). Os animais que não pertenciam aos grupos que recebiam antibióticos receberam apenas água filtrada.

Ao longo da 15ª semana de vida (durante os 5 dias que antecederam a eutanásia), os animais receberam o agonista do receptor β 3-adrenérgico CL316,243 (Sigma-Aldrich®), na dose de 1 mg/kg/dia. Esse agonista foi diluído em cloreto de sódio a 0,9% e administrado por via intraperitoneal. O esquema de administração foi baseado em dados do estudo realizado por Sanchez-Gurmaches et al (89). Durante o mesmo período, nos animais dos grupos que não receberam o agonista, foi administrada a solução de cloreto de sódio a 0,9%, no mesmo volume utilizado para administrar o CL316,243, por via intraperitoneal.

Também ao longo da 15^a semana de vida (durante os 3 dias que antecederam a eutanásia), os animais receberam triiodotironina (T3, Sigma-Aldrich®), na dose de 10 µg/dia, diluídos em 200 µL de cloreto de sódio 0,9% e administrados por via intraperitoneal. O esquema de administração foi baseado em dados do estudo realizado por Wagner et al (90). Os animais que não receberam T3, receberam cloreto de sódio a 0,9% durante o mesmo período, na mesma concentração do T3 por via intraperitoneal.

4.1.3 Procedimentos experimentais

O peso corporal, ingestão de dieta e ingestão hídrica foram avaliados duas vezes por semana, no período vespertino, entre a 5^a e a 15^a semanas de vida. A partir desses dados, as seguintes variáveis foram calculadas:

(i) Ganho de peso corporal antes e durante os tratamentos:

- Ganho de peso antes da intervenção: peso antes do tratamento com antibiótico menos (–) peso inicial.
- Ganho de peso durante o tratamento com antibióticos: peso ao final do tratamento com antibióticos – peso do início do tratamento com antibióticos.
- Ganho de peso durante o tratamento com o agonista β 3-adrenérgico: peso ao final do tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico – peso no início do tratamento com o agonista.
- Ganho de peso durante o tratamento com T3: peso ao final do tratamento com T3 – peso no início do tratamento com T3.

(ii) Ingestão hídrica durante o tratamento: média do consumo diário de água durante o tratamento com antibióticos.

(iii) Energia ingerida durante o tratamento:

A energia ingerida durante o tratamento com antibióticos, T3 e/ou agonista do receptor β 3-adrenérgico foi calculada considerando-se a quantidade de energia, em kJ por g de dieta.

(iv) Eficiência calórica:

A eficiência calórica durante o tratamento com antibióticos, T3 e/ou agonista do receptor β 3-adrenérgico foi calculada pela divisão do ganho de peso no período do tratamento pela energia ingerida no mesmo período (g/kJ).

Ao final do estudo, todos os animais foram eutanasiados por decapitação, no período matutino, de acordo com as recomendações da Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (91) e do Guia Brasileira para Boas Prática para Eutanásia em Animais do Conselho Federal de Medicina Veterinária (92). Após a eutanásia, as carcaças dos animais foram descartadas seguindo as normas para este tipo de resíduo (Lei Nacional de Resíduos Sólidos Nº 12.305/2010).

O sangue do tronco foi coletado, centrifugado (4000 g durante 15 minutos a 4° C) e o soro armazenado a -80° C, para posterior análise da concentração do TSH. Foram também dissecados os depósitos de TAB visceral (epididimal e retroperitoneal), TAB subcutâneo (inguinal e axilar), TAM (interescapular), e o fígado. Depois desses procedimentos, as massas destes tecidos foram aferidas, posteriormente armazenadas no nitrogênio e logo em seguida no freezer -80° C.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TSH

A concentração sérica do TSH foi determinada utilizando o kit de TSH ELISA (Abnova®), que é designado para determinar o TSH no soro/plasma de ratos ou camundongos. Esse kit baseia-se no princípio de um ensaio imunoenzimático ligado a enzima em fase sólida. O sistema de ensaio utilizou anticorpo purificado por afinidade, que dirigiu-se contra a molécula de TSH de camundongos intacta, para imobilização em fase sólida (microtitulação), como também esse ensaio utilizou um anticorpo anti-TSH de camundongos que estava no conjugado do anticorpo-enzima. As amostras de teste foram incubadas com os dois anticorpos, de forma a reagirem, de acordo com a quantidade de TSH, simultaneamente com os dois anticorpos. Após 3 horas de incubação a 37°C, os poços foram lavados com solução de lavagem para remover os anticorpos marcados não ligados. Uma solução de reagente (contendo o substrato TMB, ou 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), foi adicionada e incubada por 20 minutos, resultando no desenvolvimento de uma cor azul por ação da enzima, em intensidade proporcional à quantidade de TSH presente na amostra. O desenvolvimento de cores foi interrompido com a adição da solução de parada e a

cor foi alterada para amarelo. Logo em seguida foi realizada a medição em espectrofotômetro a 450nm. A concentração de TSH foi diretamente proporcional à intensidade de cor da amostra. Para realizarmos o cálculo da concentração de TSH, foi obtido o valor médio da absorbância a 450 nm (A450) para cada triplicata de padrões de referência e duplicata de controles e amostras. Construiu-se uma curva padrão, traçando a absorbância média obtida de cada padrão de referência em relação à sua concentração, em ng/ mL, com valores de absorção no eixo vertical ou Y e concentração no eixo horizontal ou X. Utilizaram-se os valores médios de absorbância de cada amostra para determinar a concentração correspondente de TSH em ng/mL, a partir da equação da reta obtida da curva padrão. Desta forma, os valores de TSH foram expressos em ng/mL e o limite mínimo de detecção foi de 0,2 ng/mL.

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão de genes relacionados à termogênese (*Ucp1*, *Ppargc1a* e *Prdm16*) e genes relacionados à ação do hormônio tireoideano (*Dio2*, *Thra*, *Thrb* e *Sc16a2*) foi analisada no TAB subcutâneo e visceral. No TAM interescapular foi analisada apenas a expressão do transcrito do gene que codifica a *Ucp1*.

4.3.1 Isolamento do RNA total

O RNA total foi extraído das amostras de TAB subcutâneo inguinal, TAB visceral epididimal e TAM interescapular. Para isso, amostras dos tecidos foram descongeladas e imediatamente homogeneizadas em tubos cônicos de 15 mL contendo o reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies®), na proporção de 0,1g de tecido por mL de Trizol, com a utilização de um homogeneizador de tecidos. As amostras de tecido foram então incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, centrifugadas a 14000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, com formação de uma fina camada de gordura na parte superior do tubo que foi descartada e as amostras centrifugadas novamente.

O sobrenadante foi então transferido para microtubos de 1,5 mL e o *pellet* descartado. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização. Os tubos foram agitados em vórtex durante 15

segundos, incubados a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Houve a formação de três fases, fase inferior de coloração vermelha, que contém o DNA; fase intermediária de coloração branca, contendo proteínas; e fase superior incolor, que contém o RNA. Apenas a fase superior (aquosa), que contém o RNA, foi transferida para outro microtubo de 1,5mL, onde foram adicionados 500µL de isopropanol absoluto (por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização). Os tubos foram agitados em vórtex, incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C, com formação de *pellet* de RNA. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 9000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do *pellet*. O *pellet* foi então ressuspenso em volumes de 20 a 50 µL de água MilliQ tratada com dietilpircarbonato 0,1% (DEPC 0,1%) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA®) e as amostras mantidas a -80°C até sua utilização.

4.3.2 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada no espectrofotômetro de microvolume NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific®, Wilmington, Delaware USA), utilizando-se 1 µL da amostra.

A concentração de RNA total foi fornecida automaticamente pelo equipamento em µg/µL, determinada pelo seguinte cálculo: $(DO\ 260\ \text{nm} \times 40) / 1000$, em que DO 260 representa o valor da densidade óptica da amostra determinada no comprimento de onda 260 nm. O grau de pureza da amostra, também fornecido automaticamente pelo equipamento, foi calculado pela razão entre as densidades ópticas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Consideraram-se satisfatórias as amostras com grau de pureza entre 1,7 e 2,0, visto que estes valores representam baixa contaminação com proteínas.

4.3.3 Tratamento do RNA com enzima DNase

As amostras de RNA total foram tratadas com enzima desoxirribonuclease (DNase) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) durante 10 minutos, a temperatura

ambiente e de acordo com o protocolo do fabricante, com a finalidade de evitar possibilidade de contaminação com DNA genômico e, conseqüentemente, sua influência sobre a avaliação da expressão gênica.

4.3.4 Avaliação da integridade do RNA

Foi determinada a integridade do RNA total extraído das amostras de tecido adiposo por eletroforese em gel de agarose a 1%, com o objetivo de visualizar o RNA ribossômico 18S e 28S. A observação de bandas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S foi considerada indício de não degradação de RNA nas amostras.

4.3.5 PCR (reação de polimerase em cadeia) quantitativa em tempo real

A transcrição reversa (RT, *reverse transcription*) e a amplificação do cDNA foram realizadas a partir do RNA total extraído das amostras, em único passo, por PCR quantitativa em tempo real utilizando o kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). O produto de amplificação de cada amostra foi analisado pelo fluoróforo SYBR® Green. Os fluoróforos se intercalam na fita dupla de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência, cuja intensidade é proporcional à quantidade do produto de amplificação. A fluorescência detectada foi representada por meio do Ct (ciclo limiar, *cycle threshold*), que indica o ciclo, na reação de amplificação, a partir do qual a amplificação se torna exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems), em triplicatas, para volume final de 10 µL, de acordo com instruções do fabricante. Uma reação controle negativo, ou seja, sem amostra de RNA total, foi realizada para cada par de *primers* a fim de se verificarem possíveis contaminações.

As reações foram conduzidas em termociclador AB7500 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). As seqüências dos iniciadores ou *primers* utilizados estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos *primers* utilizados para determinação da expressão gênica relativa por PCR quantitativa em tempo real.

Primer¹	Proteína correspondente	Sequência
<i>Ucp1</i>	Proteína desacopladora tipo 1	F: 5'-ACTGCCACACCTCCAGTCATT-3' R: 5'-CTTTGCCTCACTCAGGATTGG-3'
<i>Prdm16</i>	Proteína 16 contendo o domínio PR	F: 5'-CAGCACGGTGAAGCCATTC-3' R: 5'-GCGTGCATCCGCTTGTG-3'
<i>Ppargc1a</i>	Coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma	F: 5'-CCCTGCCATTGTTAAGACC-3' R: 5'-TGCTGCTGTTCTGTTTTTC-3'
<i>Thra</i>	Receptor do hormônio da tireoide alfa	F: 5'-CTGACCTCCGCATGATCGG-3' R: 5'-GGTGGGGCACTCGACTTTC-3'
<i>Thrb</i>	Receptor do hormônio da tireoide beta	F: 5'-ACACCAGCAATTACCAGAGTG-3' R: 5'-GCAGCTCGAAGGGACATGA-3'
<i>Dio2</i>	Deiodinase tipo II	F: 5'-CAGCTTCCTCCTAGATGCCTA-3' R: 5'-CTGATTCAGGATTGGAGACGTG-3'
<i>Slc16a2</i>	Transportador de Monocarboxilato 8	F: 5'-CGGCTGGATAGTGGTGTGTTG-3' R: 5'-CAGAGTTATGGATGCCGAAGATG-3'
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	F: 5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3' R: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'

¹ Identificação do primer pelo gene correspondente F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

As condições de termociclagem na PCR foram:

- Programa de transcrição reversa: 48°C durante 30 minutos;
- Ativação da Taq DNA polimerase: 95°C durante 10 minutos;
- Quarenta ciclos de desnaturação (95°C durante 15 segundos) e anelamento e amplificação (60°C durante 1 minuto);
- Curvas de dissociação (programa de dissociação do produto de amplificação): realizadas após cada reação com o objetivo de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* e/ou de produtos inespecíficos de amplificação. Para isso, as amostras foram submetidas a aumentos gradativos de temperatura (acréscimos de 0,3°C) de 60°C para 95°C. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto

correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação T_m (*melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A T_m é específica para cada sequência de DNA amplificada e, assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado

A expressão relativa do RNAm de cada um dos genes alvo foi determinada pelo método comparativo $\Delta\Delta Ct$, com normalização para o gene de referência que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Para isso, os valores de Ct obtidos para cada amostra nas reações de amplificação dos genes alvo (cuja expressão se objetivou quantificar) foram subtraídos do valor do Ct obtido para as mesmas amostras nas reações de amplificação do gene referência (*Gapdh*), sendo obtido o ΔCt .

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene referência}}$$

A quantificação relativa de cada gene alvo foi obtida por meio do método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$. Segundo este método, a expressão relativa do gene alvo corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{intervenção}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DEIODINASE TIPO 2

A atividade da desidiodinase tipo 2 foi dosada em colaboração com a Divisão de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com a utilização de protocolo previamente descrito por Wagner et al (90). As amostras de tecido adiposo branco subcutâneo axilar foram homogeneizadas a 0°C em uma solução tampão contendo 1xPE (0,1 M fosfato de potássio e 1 mM EDTA), 0,25 M de sacarose e 10 mM ditioneitol (DTT; pH 6,9). As amostras (100-300 µg de proteína) foram incubadas em um volume total de 300 µL com aproximadamente 100 000 c.p.m [3',5'-¹²⁵I]T4 purificado por coluna de cromatografia LH-20, 1 nM de T4 não marcado, 10 ou 20 mM DTT, na presença ou ausência de 1 mM de propiltiouracila em solução tampão PE a 37°C, por 2 horas. As reações foram interrompidas pela adição de 200 µL de soro de cavalo e 100 µL ácido tricloroacético

a 50%. Logo em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 2 minutos. O ^{125}I -livre no sobrenadante foi mensurado utilizando um contador gamma. A desiodinação foi linear com a concentração de proteína e com o tempo, e a quantidade de enzima foi ajustada para consumir menos que 30% do substrato. A atividade foi expressa como iodeto de fentomoles gerado/min por mg de proteína. Na determinação da atividade de desiodinação, a porcentagem de iodo gerada foi multiplicada por dois.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2010[®]. A análise estatística foi realizada no programa estatístico Graph Pad Prism[®] versão 5.0 para Windows[®]. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para avaliação da normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk; se o resultado do teste de Shapiro-Wilk fosse $<0,05$, rejeitava-se a normalidade dos dados. Para verificar o efeito entre a modulação da microbiota intestinal e a expressão de transcritos dos genes termogênicos, genes relacionados à ação hormônio tireoidiano e a concentração sérica de TSH, foi utilizado o teste de one way ANOVA (variáveis simétricas) com o pós-teste de Tukey. Também foi realizada a análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni para comparar as médias entre os múltiplos grupos em relação tratamento ao longo do tempo. Para avaliação da modulação da microbiota intestinal e atividade da deiodinase tipo 2 foi utilizado o Teste-T não pareado. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

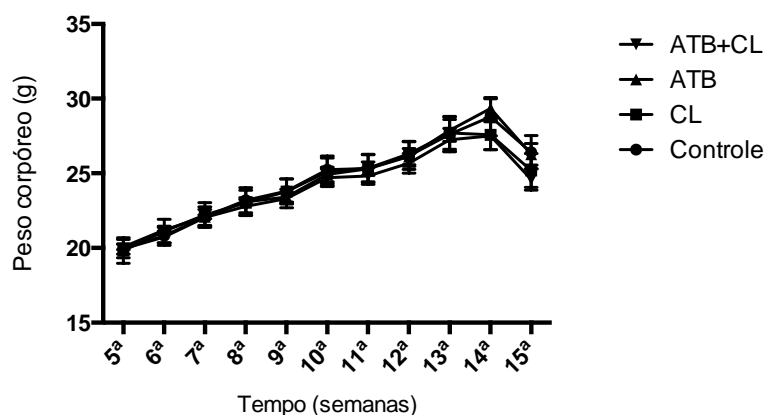
5.1 CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA NORMOLIPÍDICA

Ao longo do estudo não houve perda de camundongos. Desta forma, todas as análises foram compostas de 5 animais por grupo.

5.1.1 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa corporal

A avaliação semanal do peso corporal não mostrou nenhuma diferença entre os grupos de estudo durante todo o experimento. Além disso, foi possível observar que, durante o tratamento com antibióticos, os animais mantiveram o ganho de peso semanal (Figura 7A e 7B). Quando foram tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico (CL316, 243) ou solução de cloreto de sódio 0,9% (Figura 7A) por via intraperitoneal, os camundongos apresentaram redução do peso corporal, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos. Diferentemente, os animais tratados com T3, na presença ou ausência de antibióticos, não apresentaram esta tendência (Figura 7B).

A



B

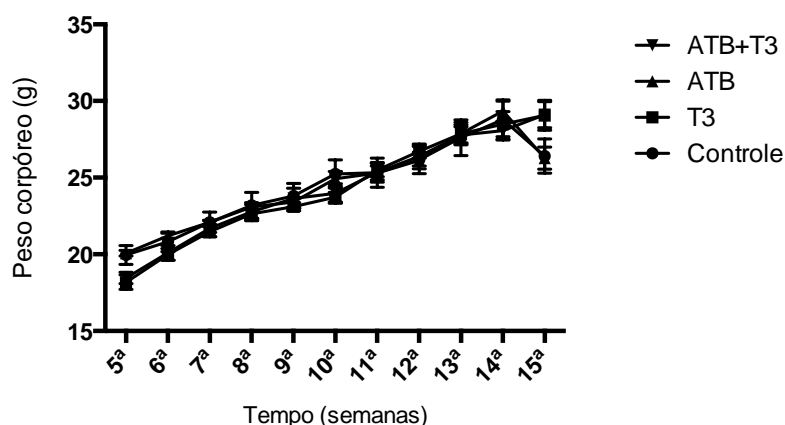


Figura 7– Peso corpóreo dos camundongos alimentados com dieta normolipídica no decorrer do estudo.

Peso médio (\pm EPM) semanal entre a 5ª e a 15ª semanas de vida dos camundongos alimentados com dieta normolipídica. (A) Tratamento com agonista do receptor β 3-adrenérgico (CL316,243), (B) tratamento com T3. Dados analisados por análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. ATB: antibiótico, CL: CL316,243, T3: triiodotironina.

5.1.2 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a ingestão de energia, eficiência calórica e ingestão hídrica

Foi observado que a ingestão de energia (Figura 8A), eficiência calórica (Figura 8B) e o consumo hídrico (Figura 8C) não diferiram entre os grupos de tratamento, durante o período em que os animais receberam antibióticos por 5 semanas, da 10ª à 15ª semanas (Figura 8).

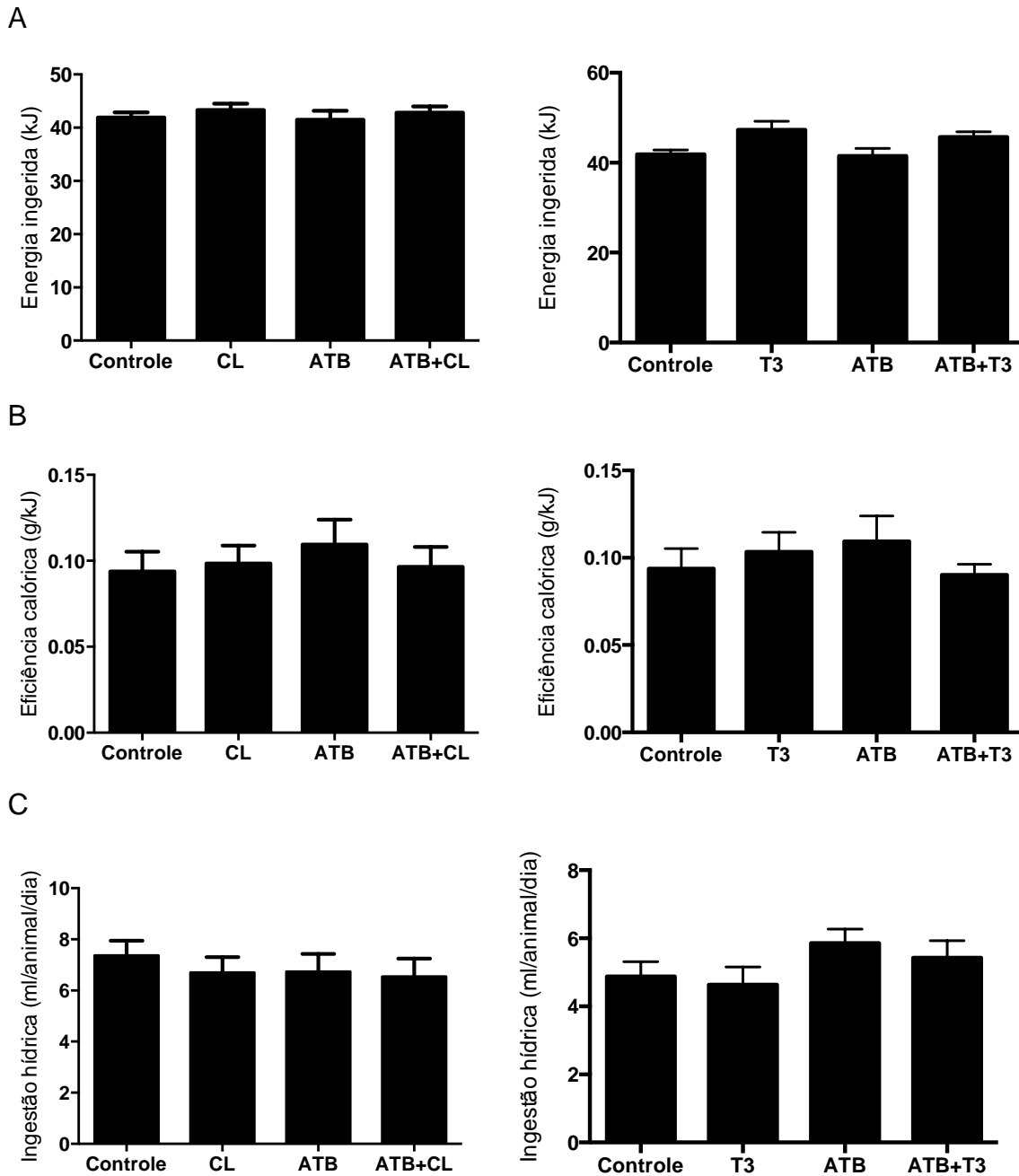


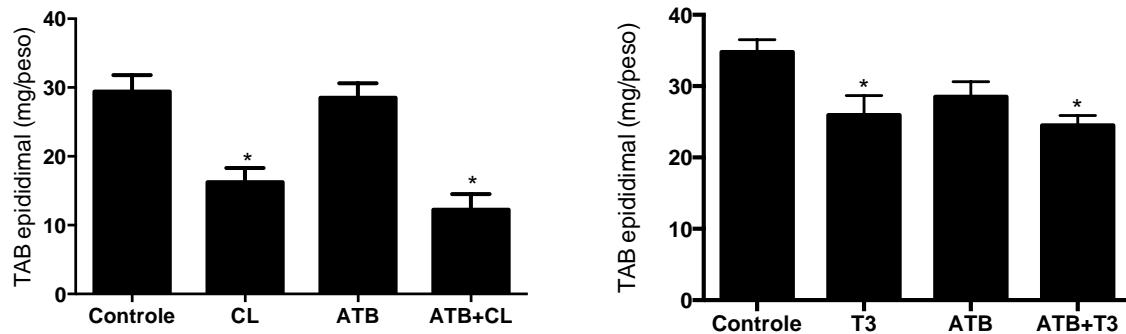
Figura 8 – Efeito do tratamento com antibióticos, durante 5 semanas, sobre a energia ingerida (A), eficiência calórica (B) e ingestão hídrica (C) em animais alimentados com dieta normolipídica. Dados apresentados como média \pm EPM e analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. ATB: antibiótico, CL: CL316,243, T3: triiodotironina.

5.1.3 Efeito modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade e a massa do fígado

Os camundongos que foram tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico durante 5 dias, na 15^a semana de vida, apresentaram redução da

massa do TAB visceral epididimal e retroperitoneal, em relação ao grupo que recebeu veículo (Figura 9A e 9B). Os animais tratados com T3 durante 3 dias apresentaram somente redução da massa do TAB visceral epididimal (Figura 9A e 9B).

A



B

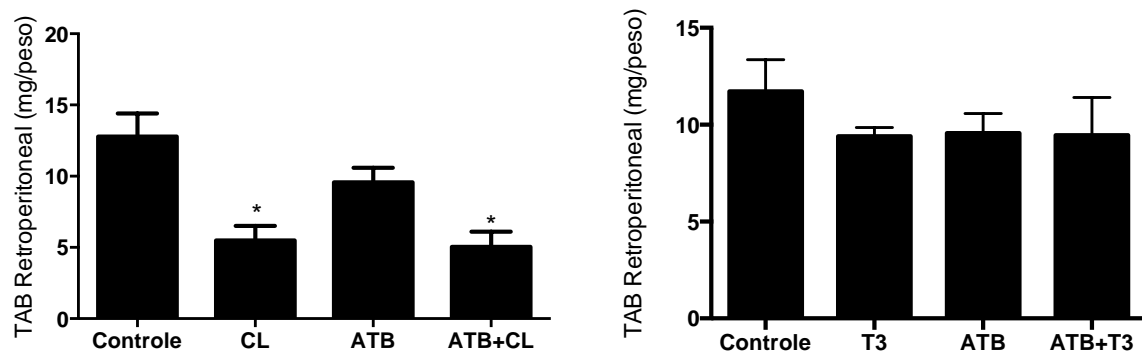


Figura 9– Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade visceral em animais alimentados com dieta normolipídica.

(A) Massa do tecido adiposo branco epididimal (visceral) e (B) massa do tecido adiposo branco retroperitoneal (visceral), corrigida pelo peso corporal. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs controle. TAB: tecido adiposo branco; ATB: antibióticos; CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

No TAB subcutâneo inguinal, somente foi observada mudança significativa no grupo de camundongos que recebeu antibióticos e o agonista do receptor β 3-adrenérgico, que apresentou redução da massa deste depósito em relação ao grupo que recebeu veículo. O T3 não modificou a massa deste depósito (Figura 10).

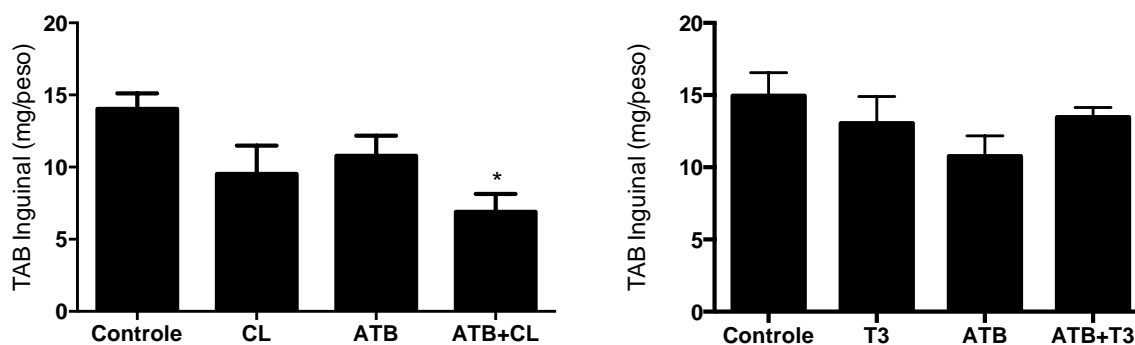


Figura 10 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade subcutânea em animais alimentados com dieta normolipídica.

Massa do tecido adiposo branco inguinal (subcutâneo), corrigida pelo peso corporal. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs controle. TAB: tecido adiposo branco; ATB: antibióticos; CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

Não foi observada modificação significativa da massa do TAM interescapular nos grupos que receberam antibióticos ou o agonista do receptor β 3-adrenérgico, isoladamente ou em combinação, em comparação com o grupo controle, embora o grupo tratado somente com antibióticos tenha apresentado tendência de aumento da massa deste depósito e os grupos que receberam o agonista β 3-adrenérgico, isoladamente ou em combinação com antibióticos, tendência de redução (Figura 11A).

O tratamento com T3, na presença de antibióticos, aumentou a massa do TAM interescapular, em comparação com o grupo controle, e foi observada tendência de aumento da massa deste depósito no grupo que recebeu somente T3 (Figura 11B).

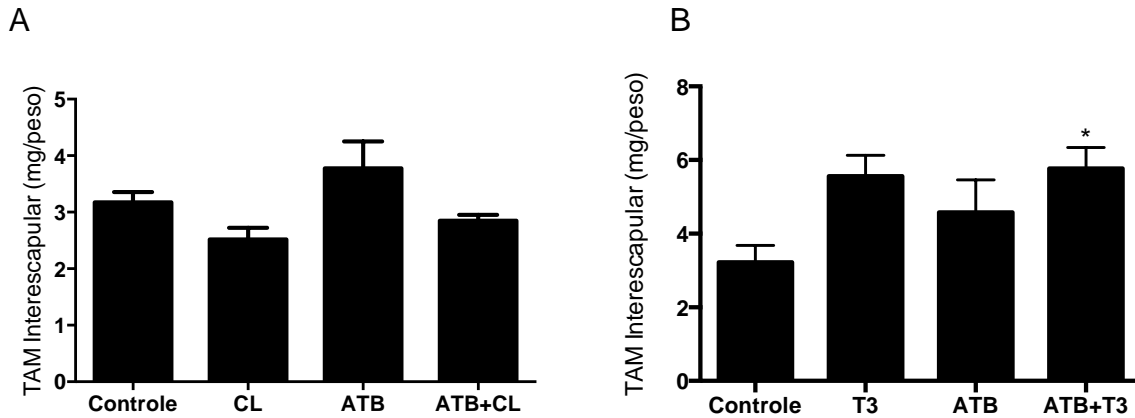


Figura 11 – Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa do TAM em animais alimentados com dieta normolipídica.

Massa do TAM interescapular, corrigida pelo peso corporal nos camundongos tratados (A) com CL316,243 e antibióticos, isoladamente ou em combinação e (B) com T3 e antibióticos, isoladamente ou em combinação. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs controle. TAM: tecido adiposo marrom; ATB: antibióticos; CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

Nenhum dos tratamentos investigados modificou a massa do fígado em relação ao grupo controle (Figura 12).

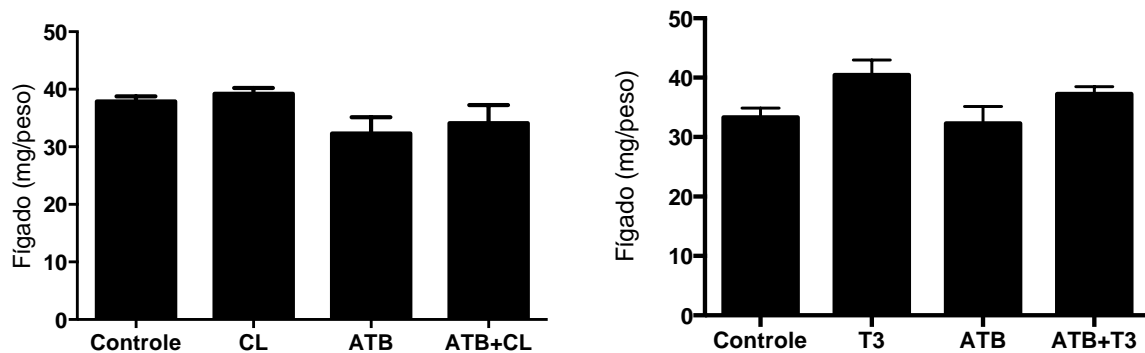


Figura 12 – Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa do fígado em animais alimentados com dieta normolipídica.

Massa do fígado, corrigida pelo peso corporal. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. ATB: antibióticos; CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

5.1.4 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo, em resposta à estimulação β 3-adrenérgica e ao T3

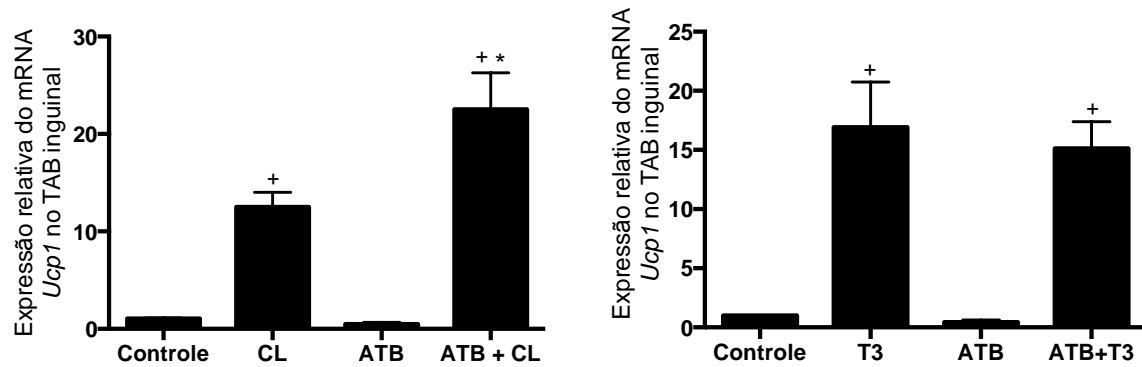
Nenhuma diferença foi encontrada em relação a expressão de *Ucp1* quando se comparou o grupo que recebeu somente antibióticos com o grupo controle nos três depósitos de tecido adiposo avaliado (Figura 13A, 13B e 13C).

No TAB subcutâneo inguinal (Figura 13A), a expressão relativa de *Ucp1* foi maior nos grupos tratados com agonista do receptor β 3-adrenérgico, isoladamente ou na presença de antibióticos, quando comparados com o grupo controle. Foi observado, ainda, aumento da indução da expressão de *Ucp1* pelo agonista do receptor β 3-adrenérgico pelo tratamento com antibióticos, uma vez que o grupo que recebeu o agonista do receptor β 3-adrenérgico e antibióticos apresentou maior níveis deste transcrito quando comparado com o grupo que recebeu somente o agonista do receptor β 3-adrenérgico. Esse mesmo comportamento foi observado no TAB visceral epididimal (Figura 13B).

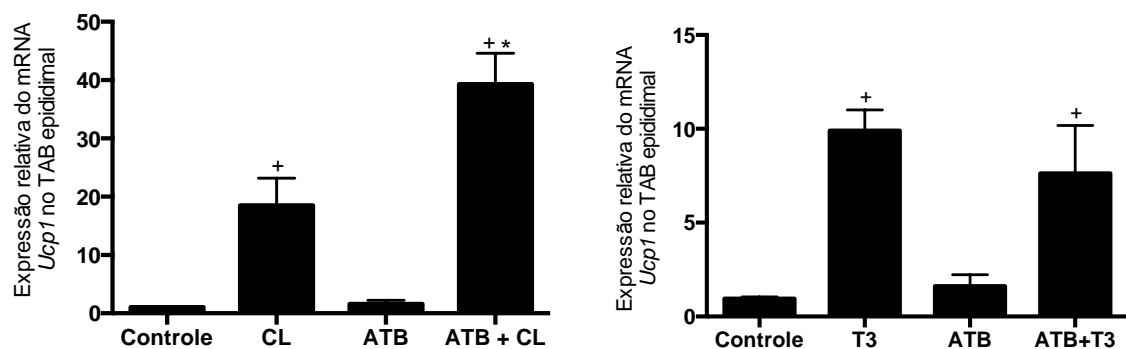
No TAM interescapular (Figura 13C), nenhuma diferença em relação à expressão de *Ucp1* foi observada entre os diferentes tipos de tratamento, embora tenha havido tendência não significativa de aumento dos níveis deste transcrito nos grupos tratados com agonista do receptor β 3-adrenérgico, quando comparados com o controle.

Nos camundongos tratados com T3 foi possível observar um aumento da expressão de *Ucp1*, quando comparados com o grupo controle, no TAB inguinal (Figura 13A) e no TAB epididimal (Figura 13B). Entretanto, no TAM interescapular (Figura 13C), houve apenas tendência não significativa de aumento da expressão deste transcrito em resposta ao T3, quando comparado com o controle. Além disso, foi possível observar que a modulação da microbiota intestinal com antibióticos não modificou a indução da expressão de *Ucp1* pelo T3 (T3 *versus* T3 +ATB).

A



B



C

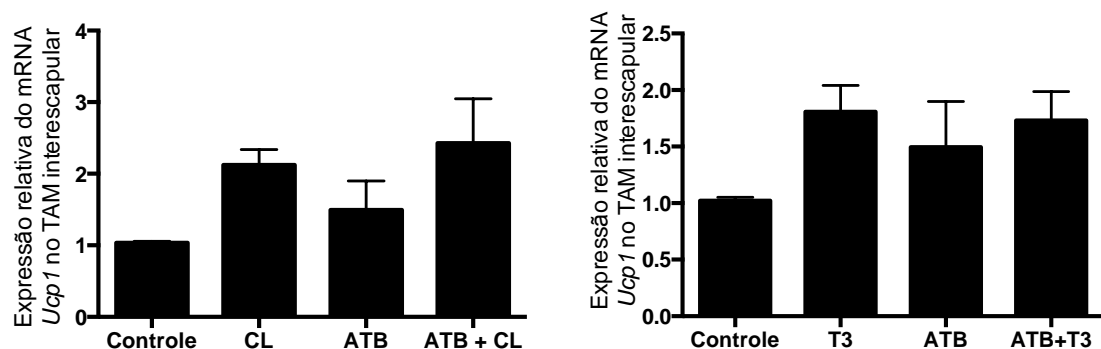


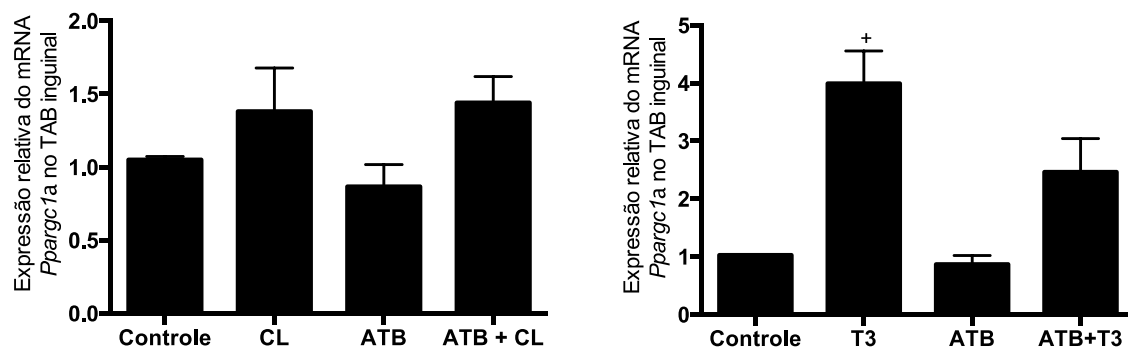
Figura 13 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de *Ucp1* em animais alimentados com dieta normolipídica.

(A) Expressão relativa de *Ucp1* no tecido adiposo inguinal (subcutâneo), (B) no tecido adiposo epididimal (visceral) e (C) no tecido adiposo marrom interescapular. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs controle; * $p < 0,05$ vs CL ou T3. TAB: tecido adiposo branco, TAM: tecido adiposo marrom. ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

O tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico não modificou a expressão relativa de *Ppargc1a* no TAB inguinal e epididimal, em relação ao controle (Figura 14A e 14B). O tratamento com T3, por sua vez, aumentou a expressão de

Ppargc1a no TAB inguinal, em relação ao controle. O co-tratamento com T3 e antibióticos reduziu a indução da expressão de *Ppargc1a* em resposta ao T3 (indução de cerca de 4 vezes em resposta ao T3 versus 2,5 vezes em resposta ao T3 e antibióticos), embora esta redução não tenha sido significativa (Figura 14A). O tratamento com T3 não promoveu nenhuma mudança na expressão de *Ppargc1a* no TAB epididimal quando se compararam os diferentes grupos de tratamento (Figura 14B).

A



B

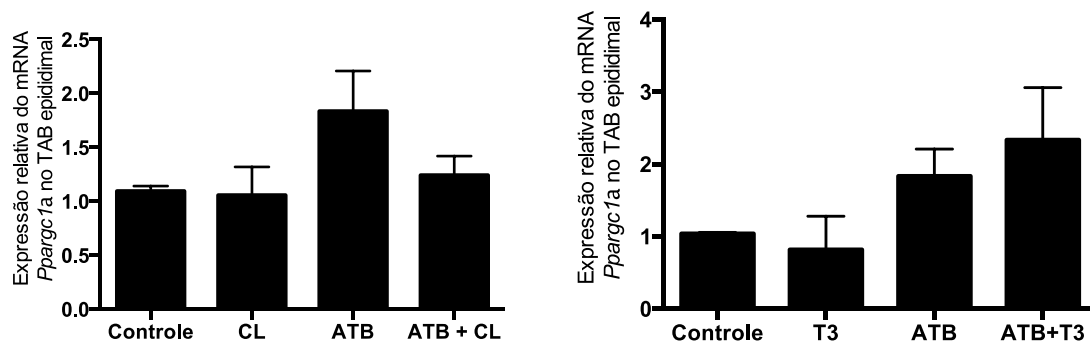


Figura 14 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor adrenérgico β_3 e do T3 sobre a expressão relativa de *Ppargc1a* em animais alimentados com dieta normolipídica.

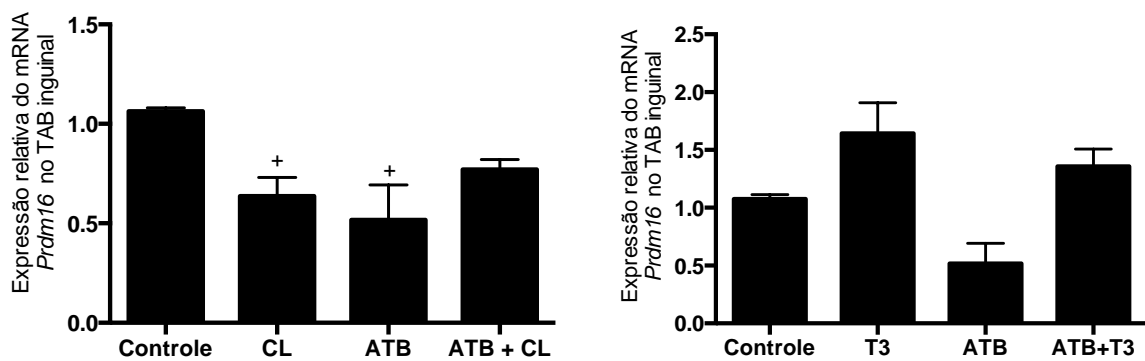
(A) Expressão relativa de *Ppargc1a* no tecido adiposo inguinal (subcutâneo) e (B) no tecido adiposo epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs controle. TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

O tratamento com o agonista do receptor β_3 -adrenérgico isoladamente e o tratamento com os antibióticos isoladamente, quando comparado com o controle, promoveram diminuição da expressão de *Prdm16* no TAB inguinal. Entretanto, o co-tratamento com antibióticos e agonista do receptor β_3 -adrenérgico não modificou significativamente a expressão relativa deste transcrito em relação ao controle ou

aos tratamentos isoladamente (antibióticos e CL versus antibióticos ou CL) (Figura 15A). No TAB epididimal nenhuma modificação da expressão de *Prdm16* foi observada quando se compararam os diferentes tipos de tratamento (Figura 15B).

Não foi observada nenhuma alteração significativa da expressão de *Prdm16* em resposta ao T3 e antibióticos, isoladamente ou em combinação, no TAB inguinal e epididimal, embora no TAB epididimal tenha havido tendência de aumento da expressão relativa deste transcrito em resposta ao T3 ou antibióticos isoladamente e em combinação (Figura 15A e 15B).

A



B

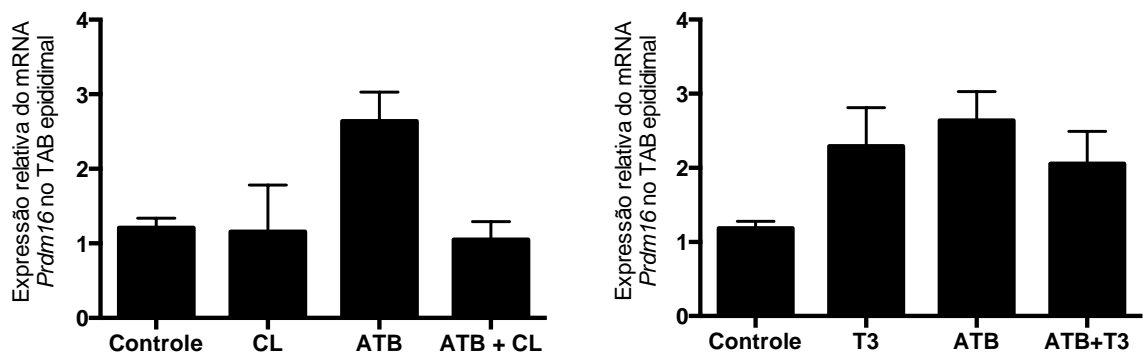


Figura 15 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de *Prdm16* em animais alimentados com dieta normolipídica.

(A) Expressão relativa de *Prdm16* no tecido adiposo inguinal (subcutâneo) e (B) no tecido adiposo epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs controle. TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

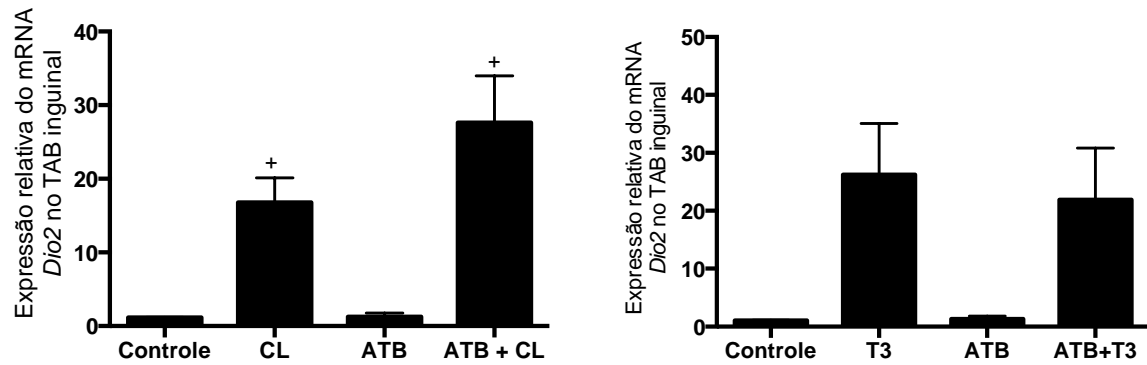
5.1.5 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano no tecido adiposo, em resposta à estimulação do β 3 adrenérgica e ao T3

Foi investigado o efeito do tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico, durante 5 dias, e o efeito do tratamento com T3, durante 3 dias, na presença ou ausência de antibióticos, sobre a expressão de genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano, incluindo os genes que codificam a desiodinase tipo 2 (transcrito *Dio2*), os receptores de hormônio tireoidiano $THR\alpha$ (transcrito *Thra*) e $THR\beta$ (transcrito *Thrb*) e a proteína de membrana transportadora de hormônio tireoidiano MCT8 (transcrito *Slc16a2*).

O tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico promoveu aumento da expressão relativa de *Dio2* no TAB inguinal e epididimal, em relação ao controle (Figura 16A e 16B). Não houve modificação da expressão deste transcrito em resposta ao tratamento com antibióticos, porém no TAB inguinal (Figura 16A) houve tendência não significativa de aumento da expressão de *Dio2* em resposta ao tratamento do agonista do receptor β 3-adrenérgico com antibióticos (indução de 27,6 vezes da expressão de *Dio2*), quando comparado ao tratamento isolado do agonista do receptor β 3-adrenérgico (indução de 16,8 vezes da expressão de *Dio2*).

O tratamento com T3 e/ou antibióticos, no TAB inguinal, não modificou a expressão relativa de *Dio2* quando se compararam os diferentes tratamentos (Figura 16A), embora tenha havido tendência de indução da expressão deste transcrito nos grupos tratados com T3 isoladamente ou em combinação com antibióticos. No TAB epididimal, foi observado aumento da expressão de *Dio2*, no grupo que recebeu T3, quando comparado com o grupo controle (Figura 16B). O tratamento com antibióticos reduziu a indução de *Dio2* pelo T3 (indução de 0,9 vez da expressão de *Dio2* em resposta a T3 e antibióticos versus 2,9 vezes na presença somente de T3) (Figura 16B).

A



B

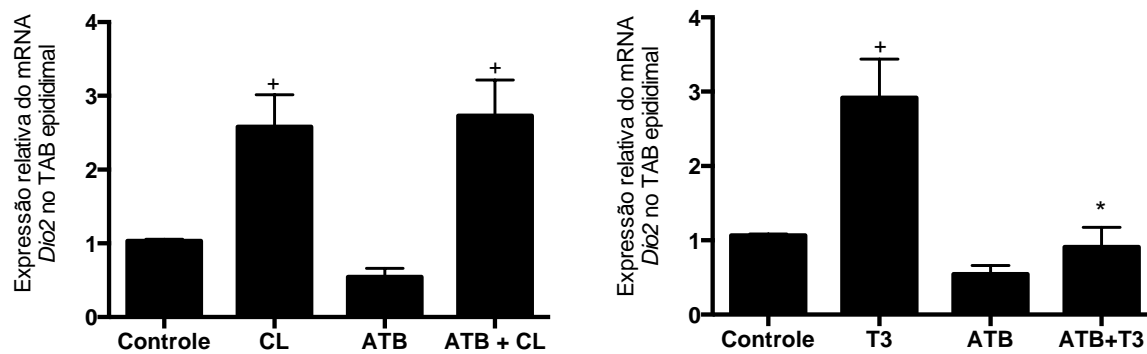


Figura 16 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β_3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa da *Dio2* em animais alimentados com dieta normolipídica.

(A) Expressão relativa de *Dio2* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs controle; * $p < 0,05$ vs T3. TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

A expressão do transcrito dos genes que codificam as duas isoformas do receptor do hormônio tireoidiano, $THR\alpha$ e $THR\beta$, também foi avaliada. No TAB inguinal não foi possível observar modificação da expressão de *Thra* quando se compararam os diferentes grupos de tratamento (Figura 17A). No TAB epididimal, foi observada diminuição da expressão de *Thra* no grupo tratado com o agonista do receptor β_3 -adrenérgico, isoladamente ou na presença de antibióticos, em relação ao grupo controle (Figura 17B).

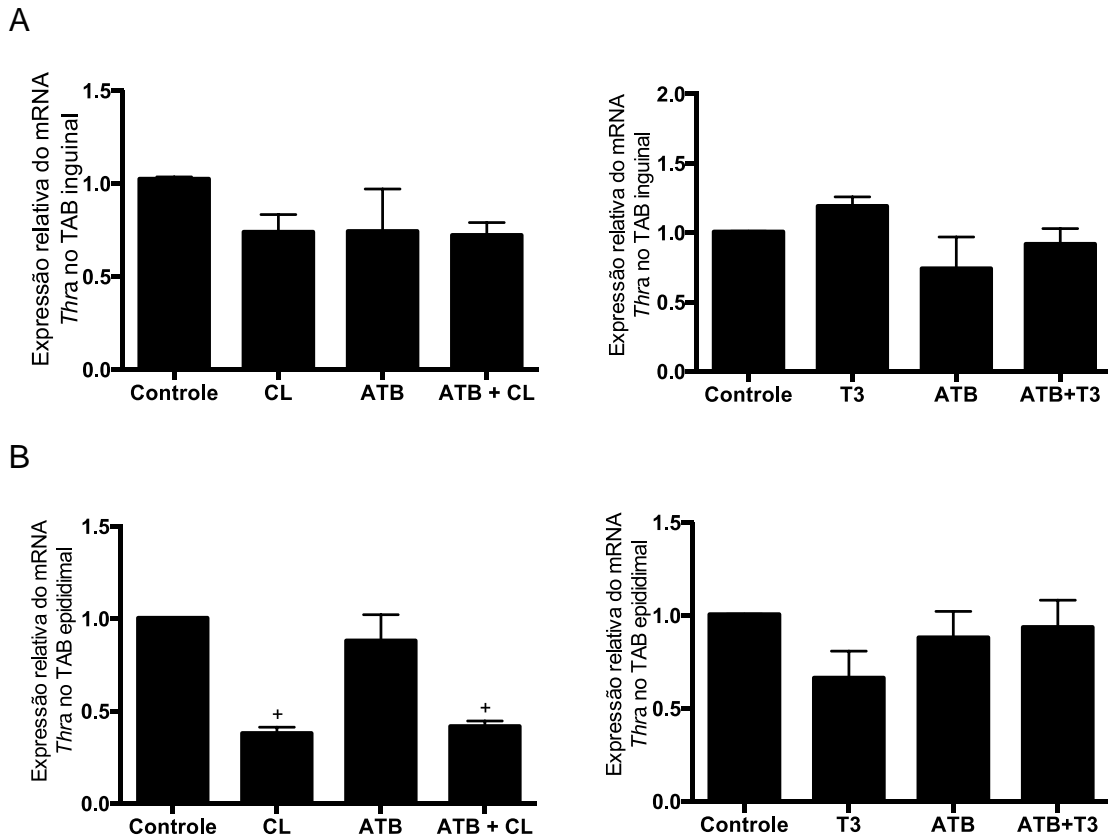


Figura 17 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β_3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa da *Thra* em animais alimentados com dieta normolipídica.

(A) Expressão relativa de *Thra* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs controle. TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

Em relação à expressão de *Thrb*, nenhuma alteração foi observada no TAB inguinal quando se compararam os diferentes tipos de tratamento (Figura 18A). No TAB epididimal, foi observada diminuição da expressão deste transcrito nos grupos que receberam o agonista do receptor β_3 -adrenérgico ou antibióticos, isoladamente ou em combinação, em relação ao grupo controle (Figura 18B).

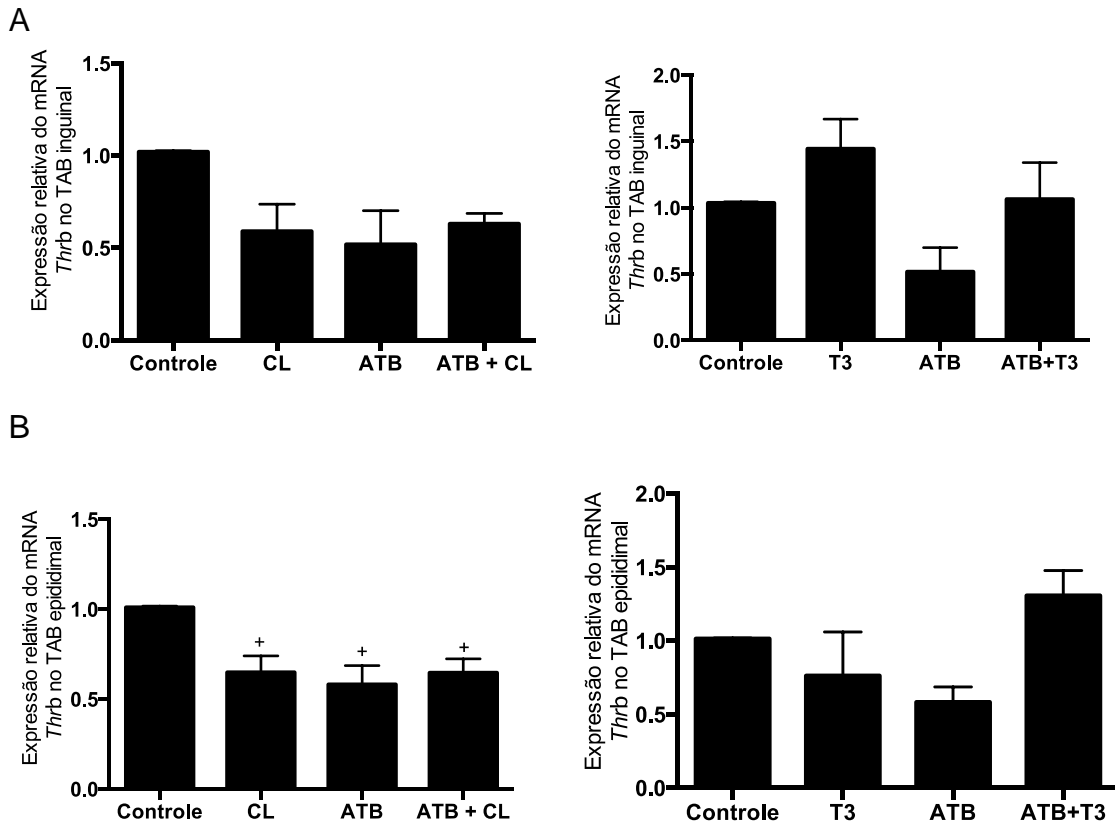
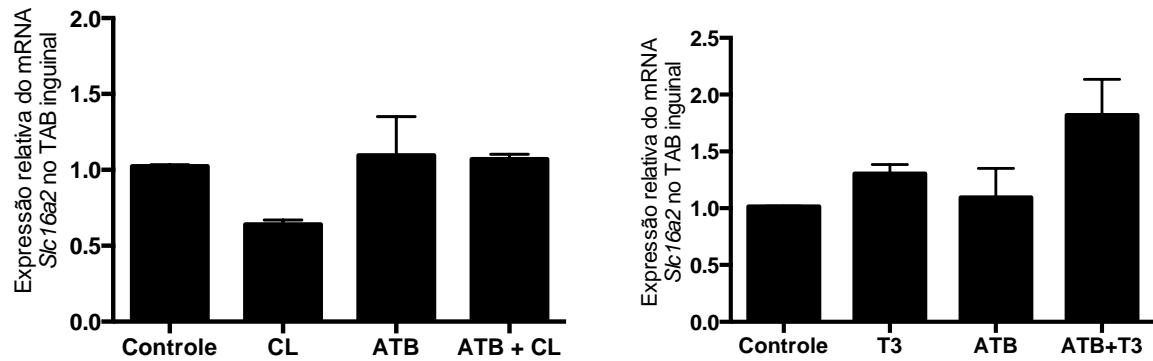


Figura 18 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β_3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa da *Thrb* em animais alimentados com dieta normolipídica. (A) Expressão relativa de *Thrb* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs controle. TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

A expressão de *Slc16a2* no TAB inguinal não foi modificada quando se compararam os diferentes tipos de tratamento (Figura 19A). No TAB epididimal, foi observado aumento da expressão de *Slc16a2* no grupo tratado somente com antibióticos, em relação ao grupo que recebeu veículo, no delineamento do estudo com uso do agonista do receptor β_3 -adrenérgico, e tendência de redução desta resposta no grupo tratado com o agonista do receptor β_3 -adrenérgico, isoladamente ou em combinação com antibióticos (Figura 19B).

A



B

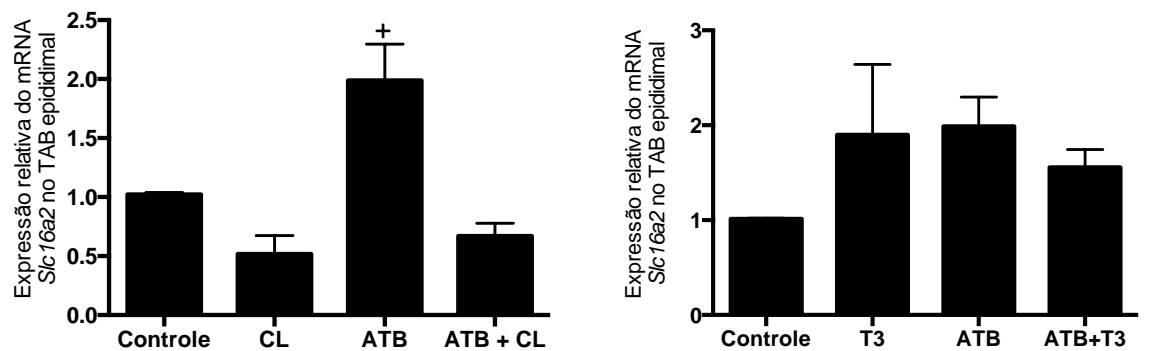


Figura 19 -Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β_3 adrenérgico e do hormônio T3 sobre a expressão relativa do transcrito do *Slc16a2* em animais alimentados com dieta normolipídica. (A) Expressão relativa de *Slc16a2* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs controle. TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

5.1.6 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, estimulação β_3 adrenérgica e T3 sobre a concentração sérica de TSH

No grupo de estudo destinado a investigar o efeito do agonista do receptor β_3 -adrenérgico, foi observada tendência de aumento da concentração sérica do hormônio estimulante da tireoide (TSH) em resposta ao tratamento com o agonista β_3 -adrenérgico e com antibióticos, porém não com sua combinação. No grupo de estudo destinado a investigar o efeito do T3, foi observado aumento significativo da concentração sérica de TSH em resposta ao tratamento com antibióticos e tendência de redução em resposta ao tratamento com T3 isoladamente (Figura 20).

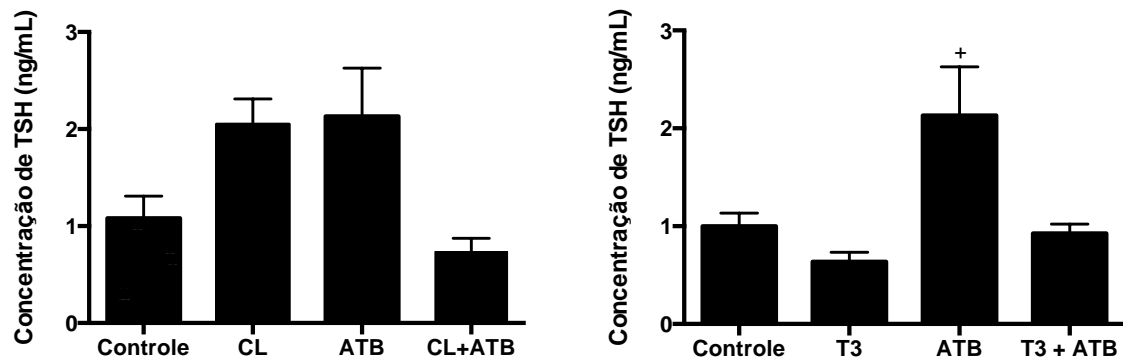


Figura 20 -Efeito dos antibióticos, agonista do receptor adrenérgico β_3 e do T3 sobre a concentração sérica de TSH em animais alimentados com dieta normolipídica.

Valores de referência do TSH: 0,55 -4,78 ng/mL. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs controle. ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

5.1.7 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a atividade da desidrinase tipo 2

Nos animais alimentados com dieta normolipídica, o tratamento com antibióticos resultou em redução significativa da atividade da desidrinase tipo 2, em relação ao controle (Figura 21).

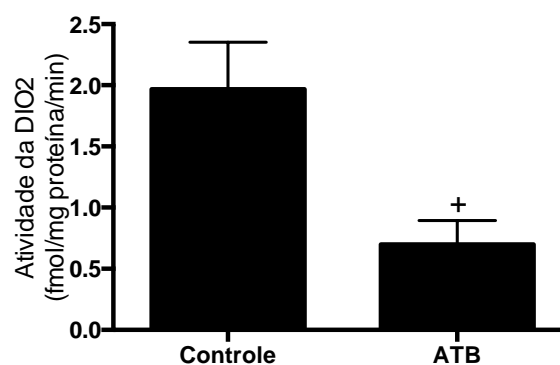


Figura 21 -Efeito da modulação da microbiota intestinal por antibióticos sobre a atividade da desidrinase tipo 2 em animais alimentados com dieta normolipídica.

Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados pelo Teste T. + $p < 0,05$ vs controle. DIO2: diiodotyrosina; ATB: antibióticos.

5.2 CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

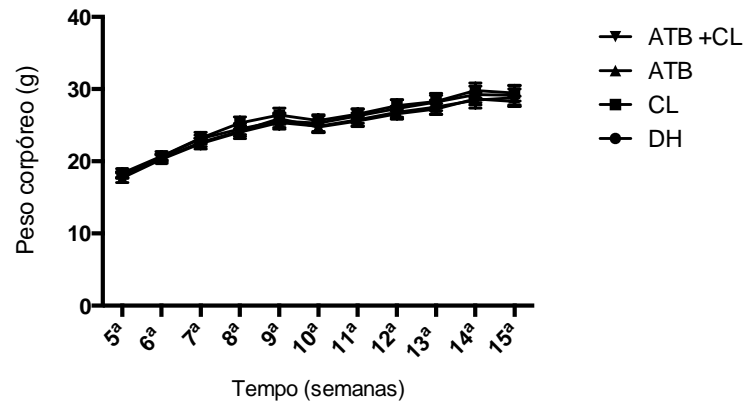
Ao longo do estudo não houve perda de camundongos. Desta forma, todas as análises foram compostas de 5 animais por grupo.

5.2.1 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa corporal

Os camundongos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram, no período de início do tratamento com antibióticos (10^a semana), peso corporal médio de $25,30 \pm 1,34$ g e, ao final do experimento (15^a semana), peso médio de $29,14 \pm 1,12$ g. Os camundongos que receberam dieta normolipídica apresentaram peso médio de $25,24 \pm 0,92$ g na 10^a semana e de $26,41 \pm 1,12$ g na 15^a semana. Embora os animais que receberam dieta hiperlipídica tenham apresentado tendência de maior peso corporal ao final do experimento, quando comparados aos que receberam dieta normolipídica, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,966$ na 10^a semana e $p = 0,155$ na 15^a semana).

A avaliação semanal do peso corporal não mostrou nenhuma diferença entre os grupos de estudo durante todo o experimento. Durante o tratamento com antibióticos por 5 semanas, os animais mantiveram o ganho de peso semanal, quando comparados aos que receberam veículo (Figura 22A e 22B). O tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico (CL316,243) durante 5 dias promoveu discreta tendência de redução do peso corporal em comparação com o controle (Figura 22A). Esta tendência não foi observada nos animais que receberam o T3 durante 3 dias (Figura 22B).

A



B

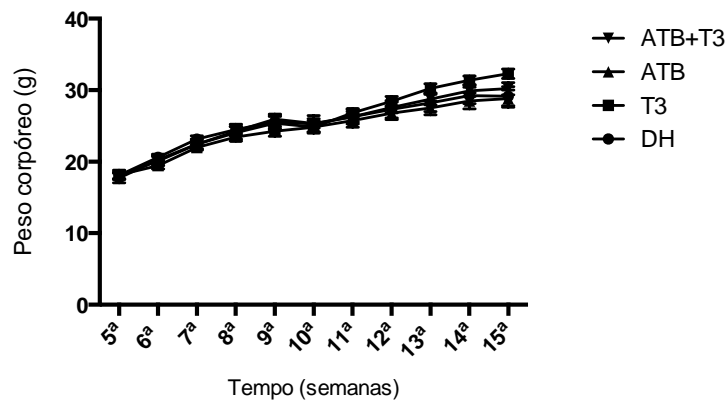


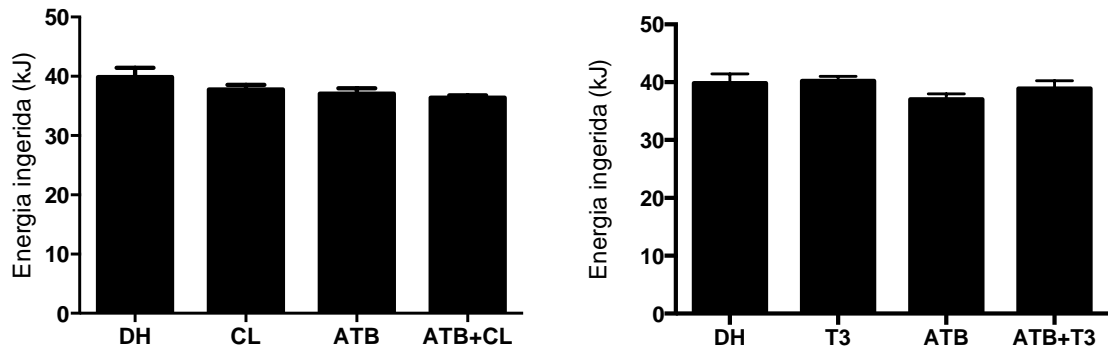
Figura 22– Peso corpóreo dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica no decorrer do estudo.

Peso médio (\pm EPM) semanal entre a 5ª e a 15ª semanas de vida dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. (A) Tratamento com agonista do receptor β 3-adrenérgico (CL316,243) e (B) tratamento com o T3. Dados analisados por análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. ATB: antibiótico, CL: CL316,243, T3: triiodotironina.

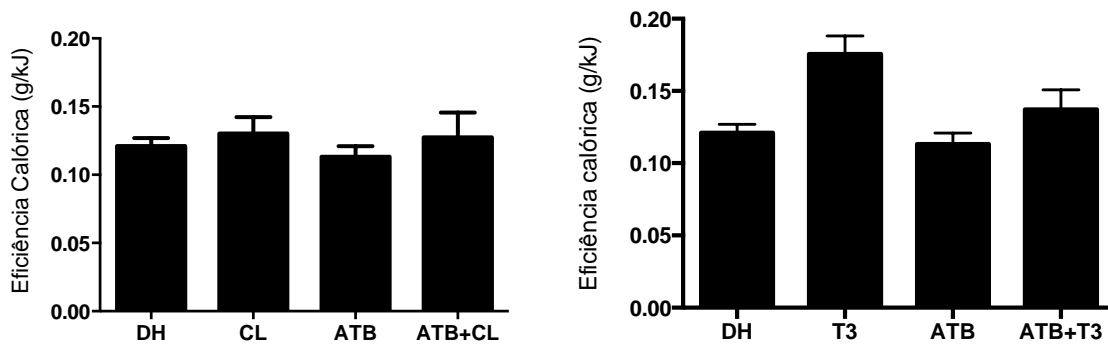
5.2.2 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a ingestão de energia, eficiência calórica e ingestão hídrica

Durante o tratamento com antibiótico por 5 semanas (10ª a 15ª semanas), a ingestão de energia (Figura 23A), eficiência calórica (Figura 23B) e o consumo hídrico (Figura 23C) não diferiram entre os grupos de tratamento.

A



B



C

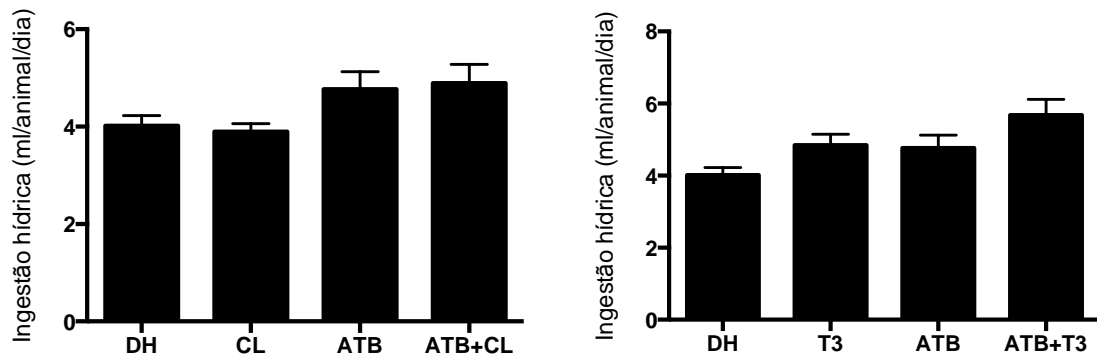


Figura 23 – Efeito do tratamento com antibióticos durante 5 semanas sobre (A) a energia ingerida, (B) eficiência calórica e (C) ingestão hídrica em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

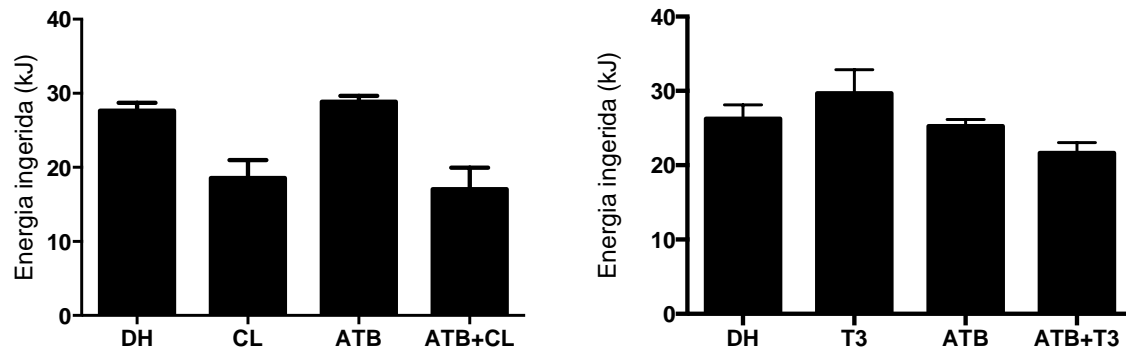
Os grupos indicados com CL e T3 representam a composição para o tratamento subsequente com estas substâncias. Dados apresentados em média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. ATB: antibióticos; DH: dieta hiperlipídica; CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

5.2.3 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a ingestão de energia e eficiência calórica em animais alimentados com dieta hiperlipídica

Não foi observada alteração da ingestão de energia dos animais que receberam antibióticos e/ou o agonista do receptor β 3-adrenérgico, embora tenha havido tendência não significativa de diminuição nos grupos tratados com o agonista β 3-adrenérgico na ausência ou presença de antibióticos (Figura 24A). Nos animais tratados com T3, não houve modificação da ingestão de energia em relação ao controle ou aos outros grupos de estudo (Figura 24A).

Foi verificada ainda, redução da eficiência calórica nos animais dos grupos que receberam o agonista do receptor β 3 adrenérgico, quando comparados aos animais controles (Figura 24B). Contudo a eficiência calórica dos animais que receberam antibióticos e/ou o T3 não foi modificada, embora tenha se observada tendência de aumento quando comparado o grupo que recebeu somente T3 com o grupo controle (Figura 24B).

A



B

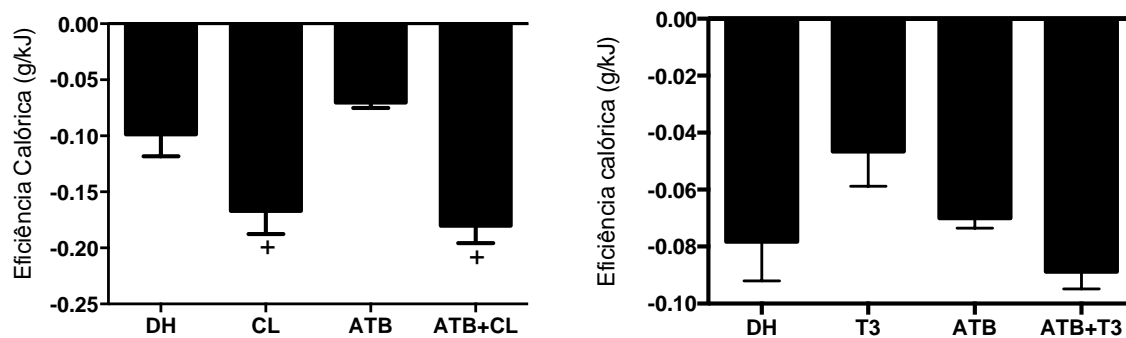


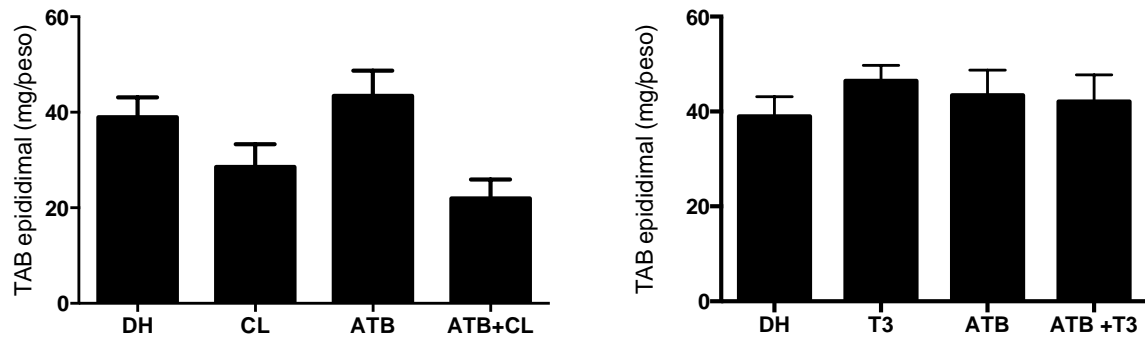
Figura 24 – Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e T3 sobre (A) a energia ingerida e (B) eficiência calórica em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Dados apresentados em média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. DH: dieta hiperlipídica; ATB: antibióticos; CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

5.2.4 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, do agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade e massa do fígado

Os camundongos tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico durante 5 dias apresentaram uma tendência não significativa de redução da massa do TAB visceral epididimal e retroperitoneal, em relação ao grupo que recebeu veículo (Figura 25A e 25B). Os animais tratados com antibióticos ou com T3 durante 3 dias não apresentaram modificação da massa do TAB visceral epididimal e retroperitoneal, quando comparados ao grupo que recebeu veículo (Figura 25A e 25B).

A



B

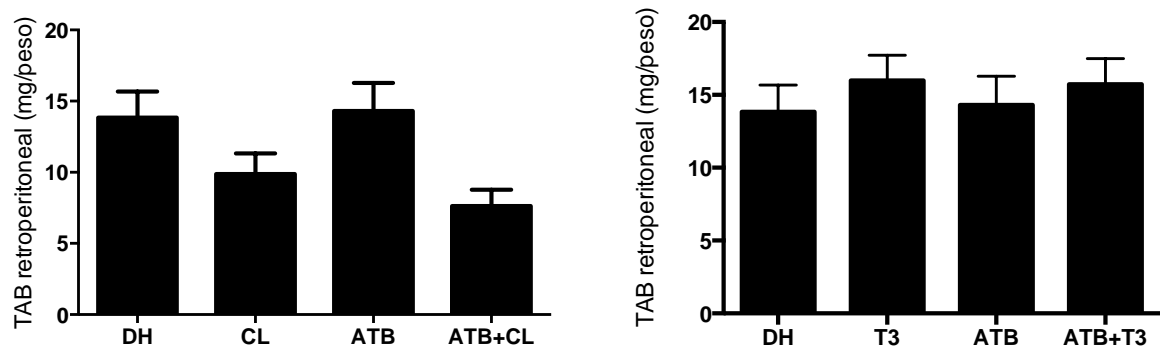


Figura 25– Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade visceral em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

(A) Massa do TAB epididimal (visceral) e (B) massa do TAB retroperitoneal (visceral), corrigida pelo peso corporal. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. DH: dieta hiperlipídica; TAB: tecido adiposo branco, ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

A massa do TAB subcutâneo inguinal não foi alterada pelo tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico ou pelo o tratamento com o T3, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal com antibióticos (Figura 26).

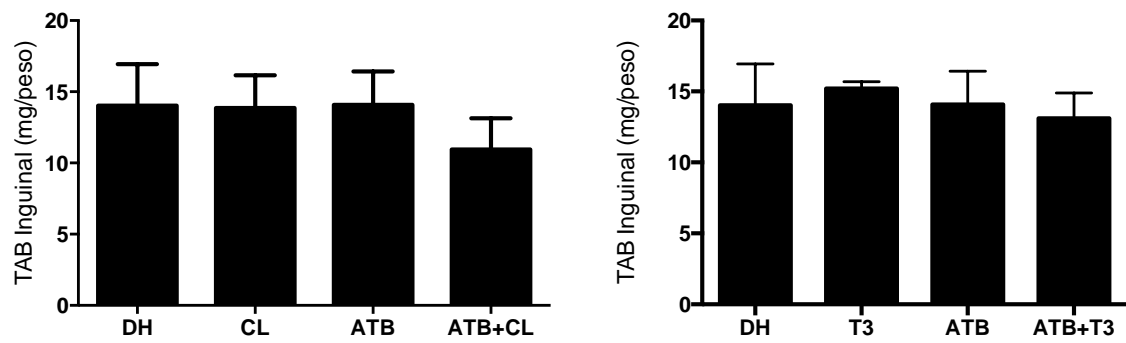


Figura 26 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a adiposidade subcutânea em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Massa do TAB inguinal (subcutâneo), corrigida pelo peso corporal. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. DH: dieta hiperlipídica; TAB: tecido adiposo branco, ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

Foi observado aumento da massa do TAM interescapular no grupo de camundongos que recebeu somente antibióticos, em comparação com o grupo que recebeu veículo. Além disso, foi observado aumento na massa do TAM interescapular nos animais tratados com o T3, em relação aos que receberam veículo, na presença ou ausência de antibióticos (Figura 27).

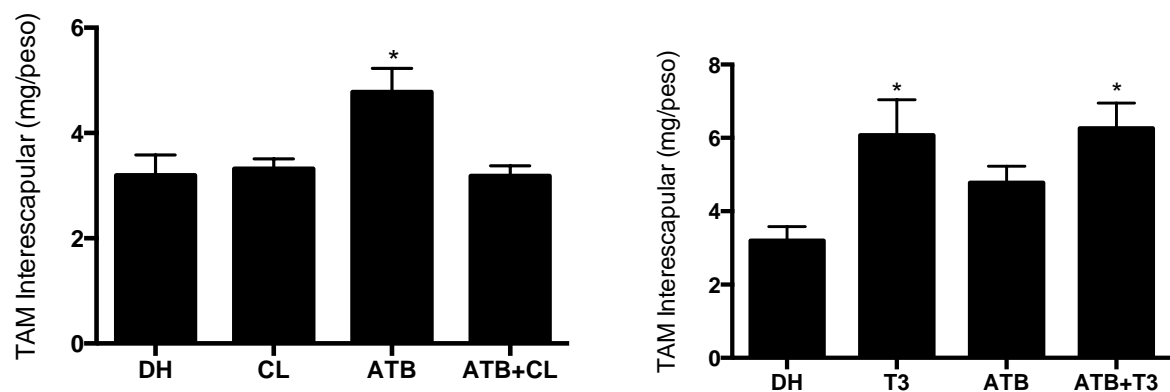


Figura 27 Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa do TAM interescapular em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Massa do TAM interescapular, corrigida pelo peso corporal. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs DH; DH: dieta hiperlipídica; TAM: tecido adiposo marrom, ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

Nenhuma alteração foi encontrada na massa do fígado, quando os diferentes grupos de estudo foram comparados (Figura 28).

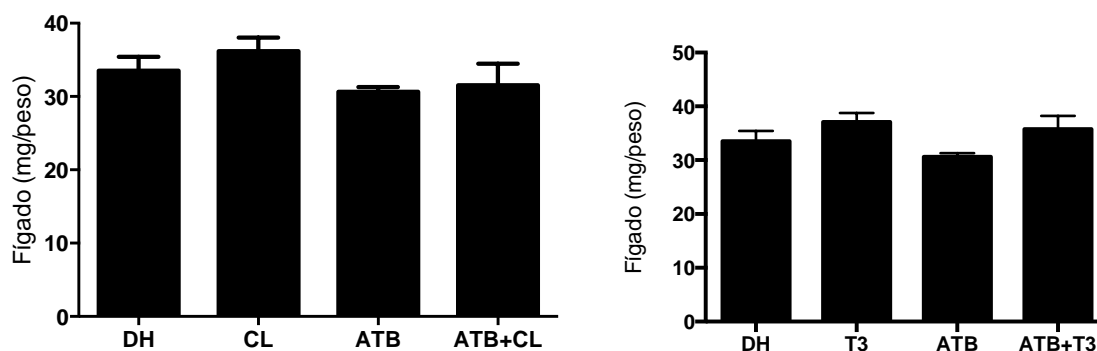


Figura 28 – Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a massa do fígado em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Massa do fígado, corrigida pelo peso corporal. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. DH: dieta hiperlipídica; ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

5.2.5 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo em resposta à estimulação β 3-adrenérgica e ao T3

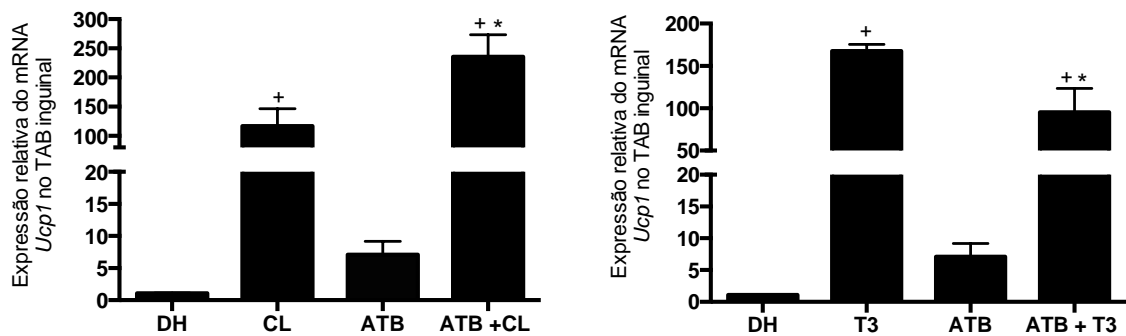
Nenhuma diferença foi encontrada em relação à expressão de *Ucp1* quando se comparou o grupo que recebeu somente antibióticos com o grupo controle, nos três depósitos de tecido adiposo avaliados, embora no TAB inguinal tenha havido tendência de aumento da expressão deste transcrito no grupo que recebeu antibióticos (Figura 29A, 29B e 29C). No TAB subcutâneo inguinal (Figura 29A) e TAB visceral epididimal (Figura 29B), a expressão relativa de *Ucp1* foi significativamente aumentada pelo tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico, quando comparado com o grupo controle. Além disso, nestes dois depósitos a indução da expressão de *Ucp1* foi acentuada pelo co-tratamento com antibióticos (Figuras 29A e 29B). No TAB inguinal, a expressão relativa média de *Ucp1* foi de 116 vezes nos animais tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico e de 235,7 vezes nos animais co-tratados com antibióticos e agonista do receptor β 3-adrenérgico (Figura 29A). No TAB epididimal (Figura 29B), a indução média da expressão de *Ucp1* foi de 6,26 vezes no grupo tratado com o agonista do receptor β 3-adrenérgico e de 11,87 vezes no grupo co-tratado com antibióticos e agonista do receptor β 3-adrenérgico.

No TAM interescapular (Figura 29C), os grupos que receberam o agonista do receptor β 3-adrenérgico, na ausência ou presença de antibióticos, apresentaram

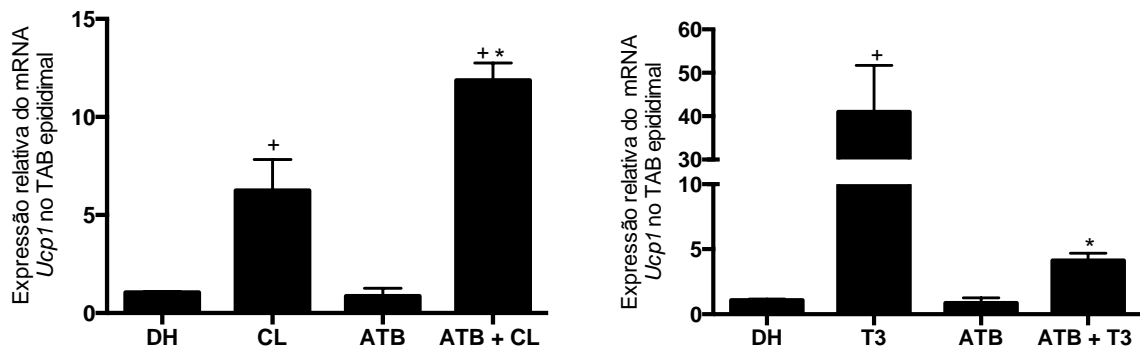
aumento da expressão relativa de *Ucp1*, quando comparados ao controle. tiveram uma maior expressão de *Ucp-1* quando comparado como grupo controle.

O tratamento com o T3 induziu aumento significativo da expressão de *Ucp1* no TAB inguinal, quando comparado com o grupo controle (Figura 29A). O co-tratamento com antibióticos reduziu significativamente a indução de *Ucp1* pelo T3; nos animais que receberam apenas T3 a indução média de *Ucp1* foi de 167,6 vezes, ao passo que os animais que receberam antibióticos e T3 apresentaram indução média significativamente inferior, de 95,21 vezes (Figura 29A). No TAB epididimal, foi observado comportamento semelhante. O tratamento com T3 induziu significativamente a expressão de *Ucp1* (média de 40,99 vezes), ao passo que o co-tratamento com antibióticos reduziu a indução pelo T3 para 4,13 vezes (Figura 29B). Não foi observada mudança da expressão de *Ucp1* no TAM interescapular em resposta ao T3 e/ou antibióticos (Figura 29C).

A



B



C

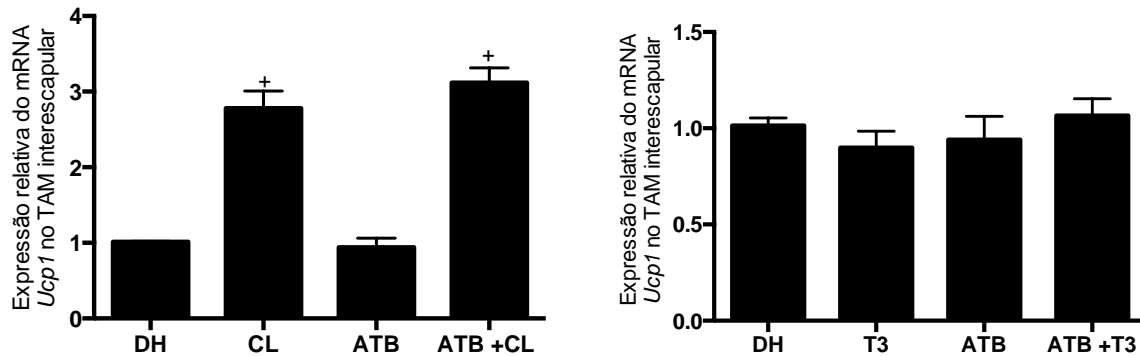


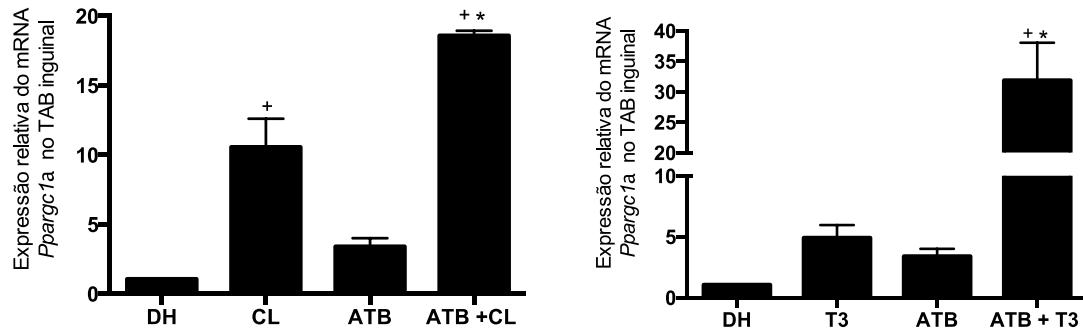
Figura 29 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de *Ucp1* em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

(A) Expressão relativa de *Ucp1* no TAB inguinal (subcutâneo), (B) no TAB epididimal (visceral) e (C) no TAB interescapular. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs DH; * $p < 0,05$ vs CL ou T3. TAB: tecido adiposo branco, TAM: tecido adiposo marrom. DH: dieta hiperlipídica; ATB: antibióticos; CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

O tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico induziu significativamente a expressão relativa de *Ppargc1a*, quando comparado ao controle (Figura 30A). O tratamento com antibióticos, isoladamente, não modificou significativamente a expressão deste transcrito, porém a indução pelo co-tratamento com antibióticos e o agonista do receptor β 3-adrenérgico foi significativamente superior (18,59 vezes) à observada em resposta ao tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico isoladamente (10,58 vezes) (Figura 30A). No TAB epididimal, foi observada indução do *Ppargc1a* em resposta ao tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico, em comparação com o grupo controle. O tratamento com os antibióticos isoladamente ou em combinação com o agonista do receptor β 3-adrenérgico não modificaram significativamente sua expressão (Figura 30B).

No TAB inguinal, os camundongos tratados com T3 ou antibióticos, isoladamente, apresentaram indução discreta e não significativa da expressão de *Ppargc1a*, quando comparados com o grupo controle (Figura 30A). O co-tratamento com T3 e antibióticos, no entanto, induziu aumento significativo da expressão relativa deste transcrito (indução média de 31,87 vezes versus de 4,9 vezes em resposta ao tratamento com T3 isoladamente (Figura 30A). No TAB epididimal, foi observado aumento discreto e significativo da expressão de *Ppargc1a* nos grupos que receberam o tratamento com T3 isoladamente ou na presença de antibióticos, quando comparados com o grupo controle (Figura 30B).

A



B

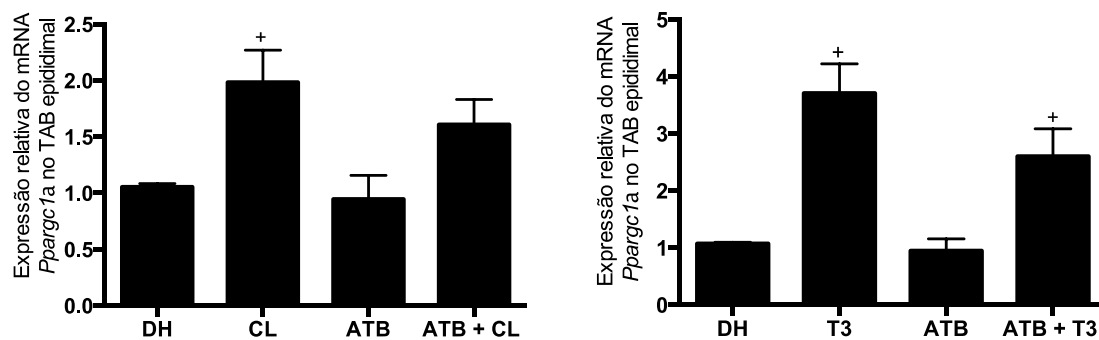
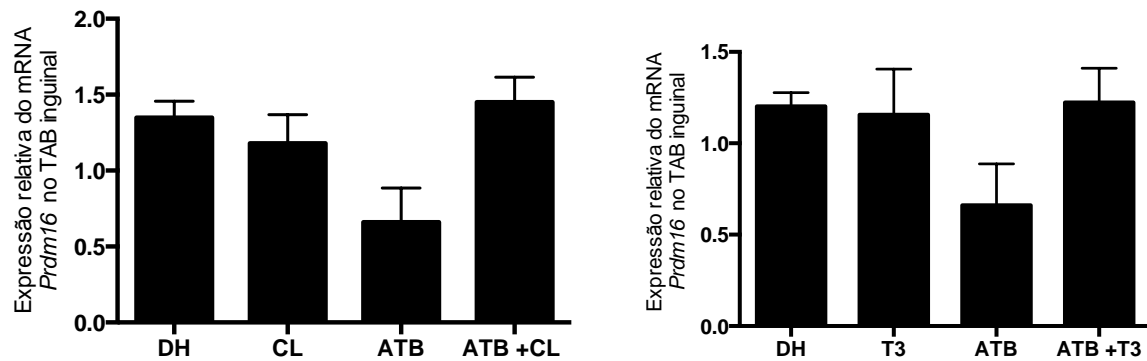


Figura 30 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de *Ppargc1a* em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

(A) Expressão relativa de *Ppargc1a* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs DH; * $p < 0,05$ vs CL ou T3. DH: dieta hiperlipídica; TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

No TAB inguinal, o tratamento com o antibióticos, ou com o agonista do receptor β 3-adrenérgico ou T3, isoladamente ou na presença de antibióticos, não promoveu modificação da expressão relativa de *Prdm16* (Figura 31A). Foi observada tendência de redução da expressão deste transcrito em resposta ao tratamento isolado com antibióticos, embora não significativa (Figura 31A). No TAB epididimal, o tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico, na ausência ou presença de antibióticos, não modificou a expressão de *Prdm16*, embora tenha sido observada tendência de redução da expressão deste transcrito em resposta ao tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico isoladamente (Figura 31B). Neste mesmo depósito, o tratamento com T3 induziu de forma discreta porém significativa a expressão de *Prdm16*, porém o co-tratamento com antibióticos aboliu este efeito (Figura 31B).

A



B

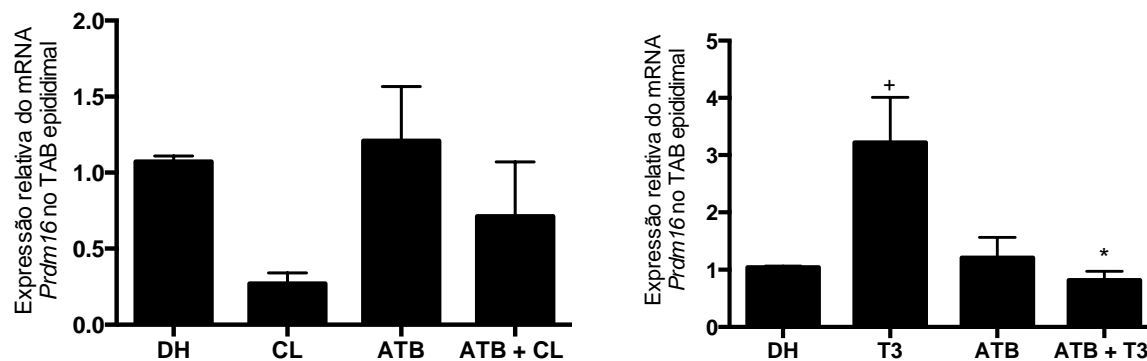


Figura 31 -Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3-adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de *Prdm16* em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

(A) Expressão relativa de *Prdm16* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs DH; * $p < 0,05$ vs T3. DH: dieta hiperlipídica. TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

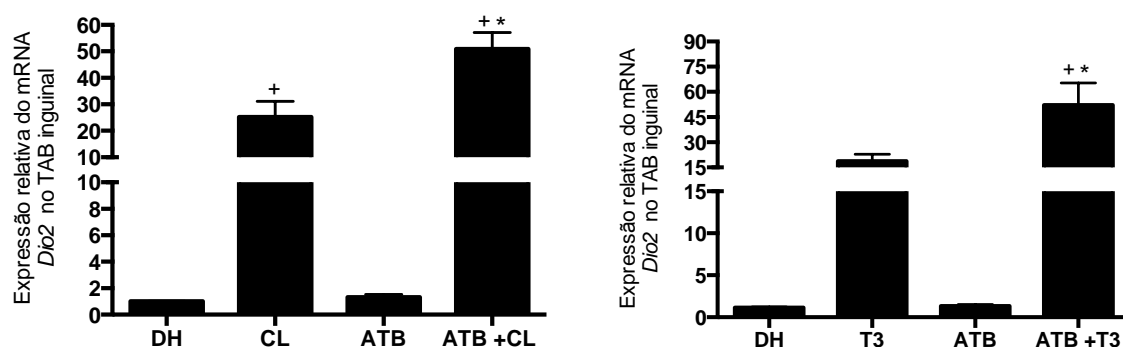
5.2.6 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano no tecido adiposo em resposta à estimulação β 3 adrenérgica e ao T3

Foi investigado, também, o efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a expressão de transcritos relacionados à ação do hormônio tireoidiano e, também, o efeito da modulação da microbiota sobre a expressão destes transcritos em resposta ao tratamento com agonista do receptor β 3-adrenérgico ou T3. Os transcritos analisados foram aqueles da desidrodinase tipo 2 (*Dio2*), dos receptores de hormônio tireoidiano $THR\alpha$ (*Thra*) e $THR\beta$ (*Thrb*) e da proteína de membrana transportadora de hormônio tireoidiano MCT8 (*Slc16a2*).

No TAB inguinal, foi observado um aumento na expressão de *Dio2* nos camundongos que receberam agonista do receptor β 3-adrenérgico, em relação ao controle. O tratamento com antibióticos, isoladamente, não modificou a expressão deste transcrito, porém o co-tratamento do agonista do receptor β 3-adrenérgico com antibióticos acentuou a indução observada em resposta ao tratamento isolado com o agonista do receptor β 3-adrenérgico (indução 50,95 vezes versus 25,18 vezes) (Figura 32A). No TAB epididimal, foi observado comportamento semelhante, porém a indução da expressão de *Dio2* foi menos acentuada, porém não significativa (Figura 32B).

No TAB inguinal, o tratamento com T3 aumentou a expressão de *Dio2*, embora o aumento não tenha sido estatisticamente significativo. O co-tratamento com antibióticos e T3 induziu significativamente a expressão deste transcrito (52,19 vezes) quando comparado com o tratamento isolado com (indução 18,79 vezes) (Figura 32A). No TAB epididimal, foi observado aumento significativo da expressão de *Dio2* nos grupos tratados com T3, na ausência ou presença de antibióticos, em relação ao controle (Figura 32B).

A



B

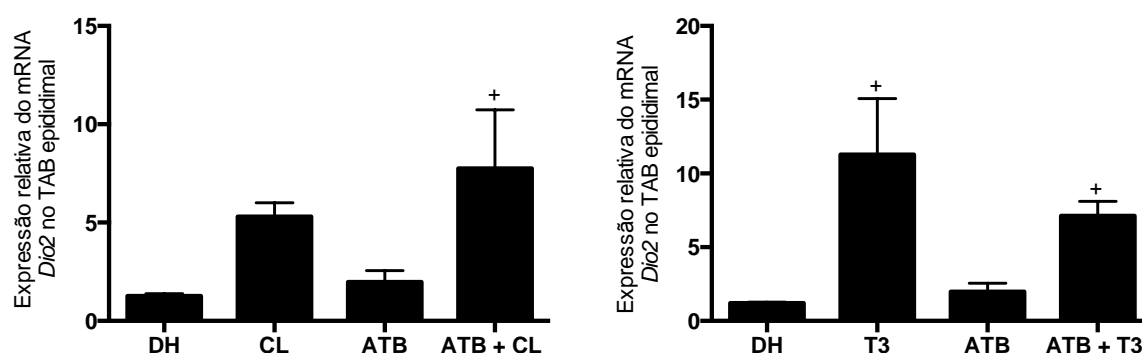


Figura 32 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β_3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa da *Dio2* em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

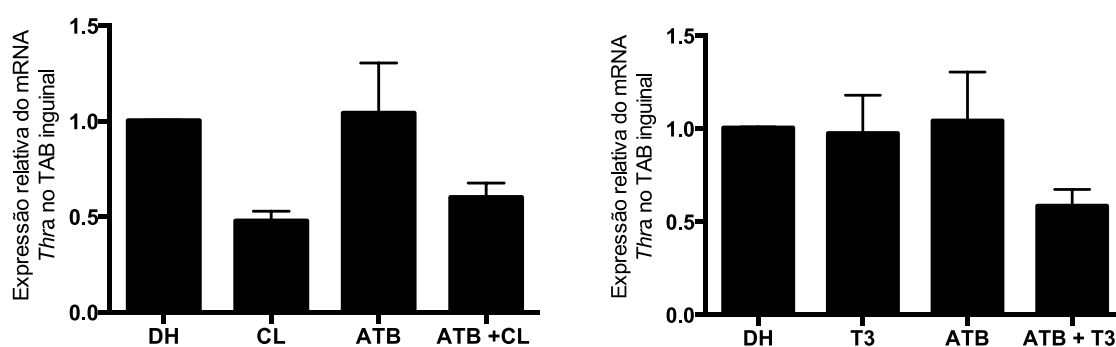
(A) Expressão relativa de *Dio2* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs DH; * $p < 0,05$ vs CL ou T3. DH: dieta hiperlipídica; TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

A expressão dos transcritos dos genes que codificam as duas isoformas do receptor do hormônio tireoidiano, $THR\alpha$ e $THR\beta$, também foi avaliada. No TAB inguinal, o tratamento com antibióticos e/ou o agonista do receptor β_3 -adrenérgico não modificou significativamente a expressão do *Thra* em relação ao controle, embora tenha sido observada redução de sua expressão em resposta ao agonista β_3 -adrenérgico (Figura 33A). No TAB epididimal, a expressão de *Thra* diminuiu em todos os grupos, em relação ao controle, e de forma mais acentuada nos grupos que receberam o agonista do receptor β_3 -adrenérgico (Figura 33B).

No TAB inguinal, o tratamento com T3 e antibióticos, isoladamente ou em combinação, não modificou a expressão relativa de *Thra*, em relação ao controle, embora tenha havido tendência de redução da expressão deste transcrito em resposta ao tratamento combinado com T3 e antibióticos (Figura 33A). No TAB

epididimal, o tratamento com T3 não modificou a expressão de *Thra*, em comparação com o controle, porém o tratamento com antibióticos reduziu significativamente a expressão deste transcrito. Além disso, o co-tratamento com T3 e antibióticos reduziu de forma mais acentuada a expressão de *Thra*, quando comparado ao tratamento isolado com antibióticos (Figura 33B).

A



B

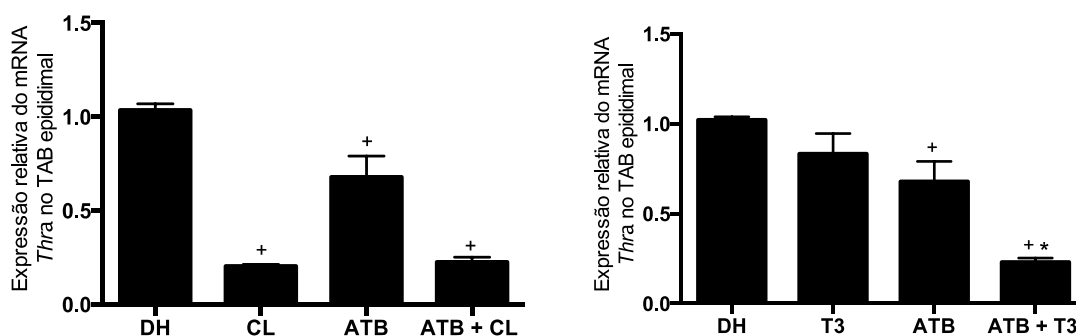


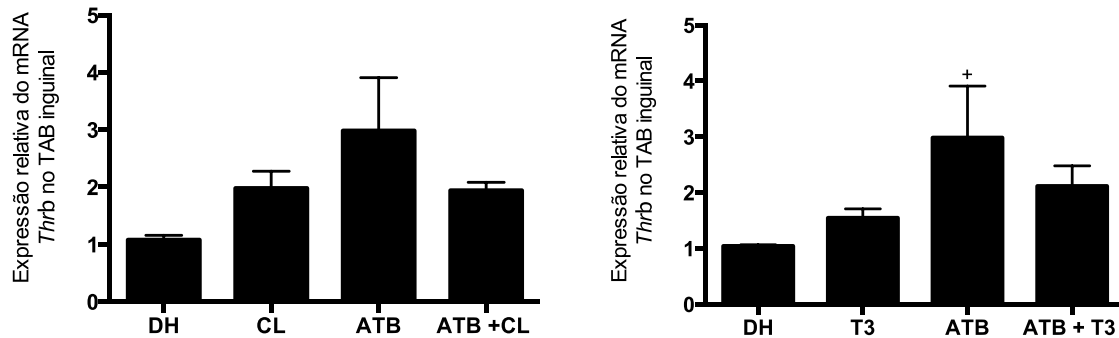
Figura 33 - Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β_3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de *Thra* em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

(A) Expressão relativa de *Thra* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs DH; * $p < 0,05$ vs T3. DH: dieta hiperlipídica; TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

A expressão de *Thrb*, no TAB inguinal, não se modificou em resposta aos tratamentos testados, embora tenha havido tendência de aumento da expressão deste transcrito nos animais que receberam antibióticos, em comparação com o controle, quando se analisaram os grupos tratados com T3 e/ou antibióticos (Figura 34A). No TAB epididimal, foi observada uma redução na expressão de *Thrb*, nos grupos que receberam o agonista do receptor β_3 adrenérgico, isoladamente ou na

presença de antibióticos, em relação ao grupo controle, e no grupo que recebeu antibióticos em combinação com o T3 (Figura 34B).

A



B

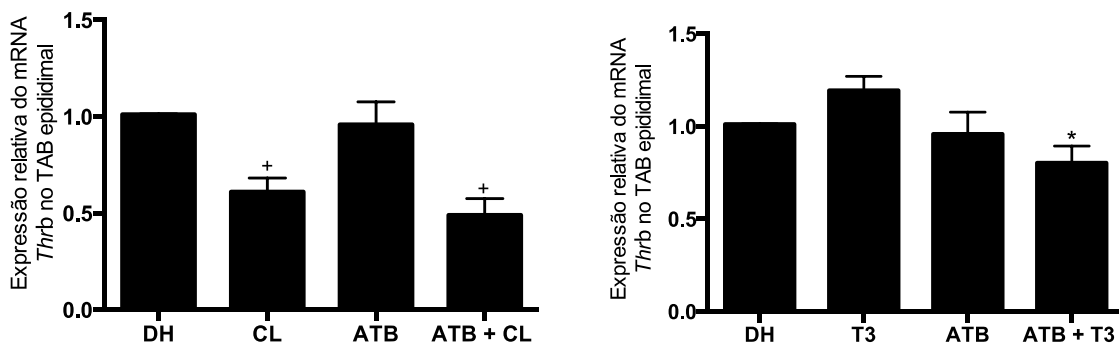
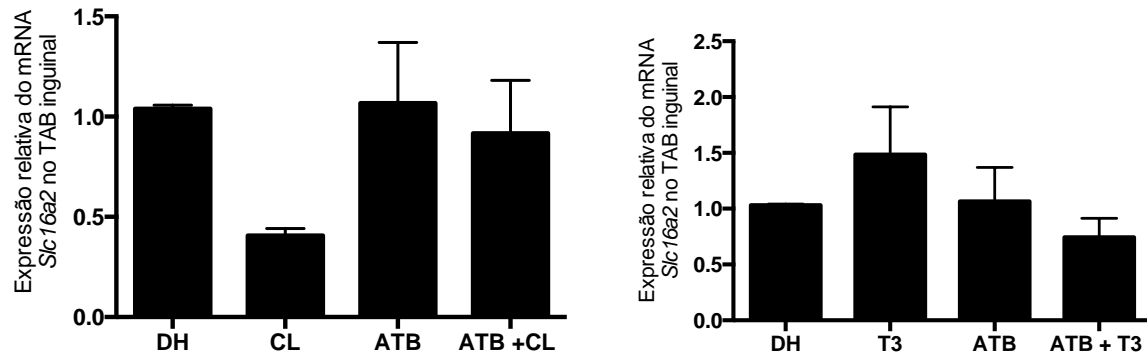


Figura 34- Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β 3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de *Thrb* em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

(A) Expressão relativa de *Thrb* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs DH; * $p < 0,05$ vs T3. DH: dieta hiperlipídica; TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

No TAB inguinal, não foi observada alteração da expressão do transcrito do gene *Sc16a2* em resposta aos diferentes tratamentos testados, embora tenha havido tendência de redução de sua expressão nos animais tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico (Figura 35A). Entretanto no TAB epididimal, o tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico, isoladamente ou em combinação com antibióticos, reduziu significativamente a expressão de *Sc16a2*, em comparação com o grupo controle. Diferentemente, o tratamento com T3 aumentou a expressão deste transcrito, em comparação com o grupo controle, porém este efeito foi abolido pelo uso de antibióticos, uma vez que o co-tratamento com T3 e antibióticos reduziu significativamente sua expressão, em relação ao controle e em relação ao grupo tratado com T3 isoladamente (Figura 35B).

A



B

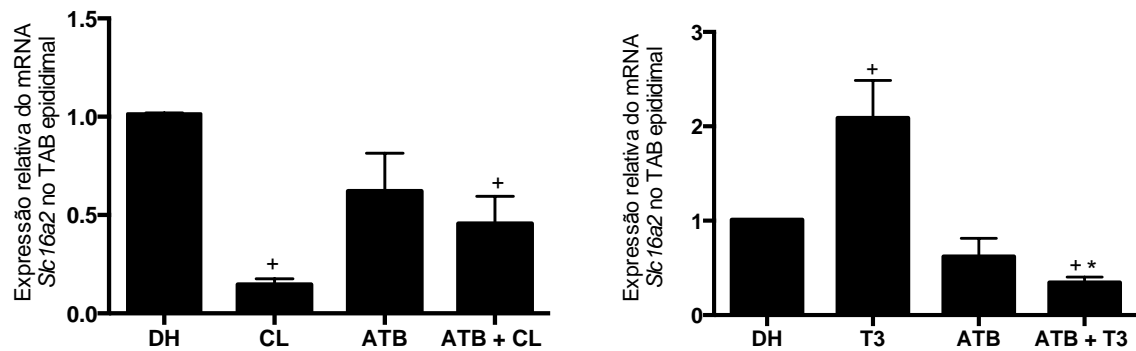


Figura 35- Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β_3 adrenérgico e do T3 sobre a expressão relativa de *Sc16a2* em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

(A) Expressão relativa de *Sc16a2* no TAB inguinal (subcutâneo) e (B) no TAB epididimal (visceral). Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. + $p < 0,05$ vs DH; * $p < 0,05$ vs T3. DH: dieta hiperlipídica; TAB: tecido adiposo branco ATB: antibióticos, CL: CL316,243; T3: triiodotironina.

5.2.7 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos, estimulação β_3 adrenérgica e T3 sobre a concentração sérica de TSH

Nenhum dos tratamentos testados modificou significativamente a concentração sérica de TSH, embora o tratamento com antibióticos, o agonista β_3 -adrenérgico e o T3 tenham resultado em tendência de redução desta variável (Figura 36).

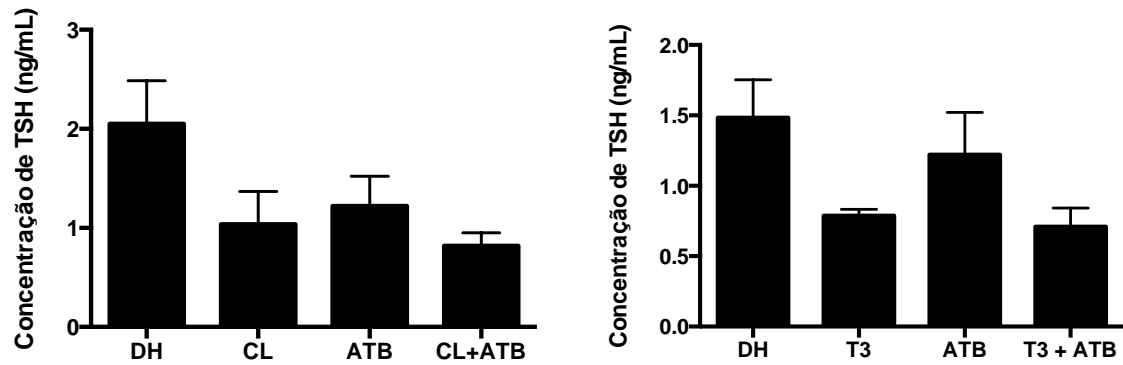


Figura 36 -Efeito dos antibióticos, agonista do receptor β_3 adrenérgico e do T3 sobre as concentrações séricas de TSH em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Valores de referência do TSH: 0,55 -4,78 ng/mL. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados por análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. DH: dieta hiperlipídica; ATB: antibióticos, CL = CL316,243; T3 = triiodotironina.

5.2.8 Efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a atividade da desidrinase tipo 2

A atividade da desidrinase tipo 2 não foi modificada pelo tratamento com antibióticos, nos animais alimentados pela dieta hiperlipídica, em relação ao grupo controle, embora tenha havido tendência de redução (Figura 37).

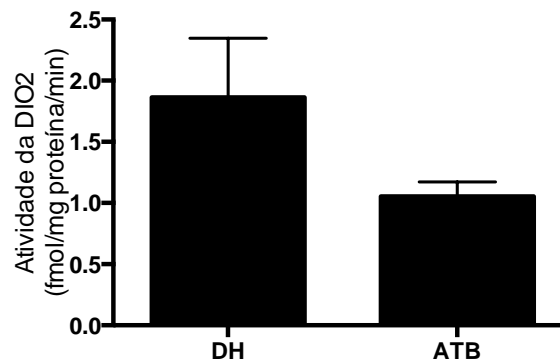


Figura 37 - Efeito dos antibióticos sobre a atividade da desidrinase tipo 2 em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Dados apresentados como média \pm EPM. Dados analisados pelo Teste T. $+p < 0,05$ vs controle. DIO2: desidrinase tipo 2; DH: dieta hiperlipídica; ATB: antibióticos.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigou-se o efeito da modulação da microbiota intestinal de camundongos C57Bl/6, alimentados com dieta normo ou hiperlipídica, no efeito dos principais componentes da resposta ao frio no tecido adiposo marrom e no amarronzamento do tecido adiposo branco, ou recrutamento dos adipócitos bege. O principal desfecho analisado foi a expressão do transcrito do gene que codifica a UCP1, e foi observado um efeito divergente da modulação da microbiota intestinal na resposta do tecido adiposo branco à estimulação β 3-adrenérgica e pelo hormônio triiodotironina.

A composição da microbiota intestinal é dinâmica e adaptável, e uma série de estratégias, incluindo o uso de antibióticos, têm sido utilizadas para modular sua composição e investigar seus efeitos sobre variados desfechos. Neste estudo, utilizamos a combinação dos antibióticos vancomicina (0,5 g/L) e ciprofloxacina (0,2 g/L), administrada na água de beber dos camundongos por 5 semanas, com a finalidade de promover modulação da microbiota intestinal. Durante o período de tratamento, os camundongos que receberam dieta normolipídica e hiperlipídica apresentaram o peso corporal dentro da faixa esperada de crescimento para camundongos C57BL/6 machos e comparável à do grupo controle, não tendo havido, portanto, interferência do uso de antibióticos no peso corporal.

Resultados semelhantes foram observados no estudo realizado por Cho et al (93) em camundongos fêmeas alimentadas com dieta normolipídica e que receberam tratamento com vancomicina (1 μ g/g de peso corporal), por 7 semanas, na água de beber. Entretanto, no estudo realizado por Murphy et al (94), camundongos C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica e tratados durante 8 semanas com vancomicina (2 mg/dia), administrada por gavagem, apresentaram redução do peso corporal, apesar de não ter havido mudança da ingestão de energia. A ciprofloxacina foi utilizada em outros estudos para modulação da microbiota intestinal, como no de Norville et al (95), em camundongos A/Jola alimentados com dieta normolipídica e infectados com *Coxiella burnetii*. Os animais foram tratados por 7 dias com 50 mg/kg de ciprofloxacina, duas vezes ao dia na água de beber ou uma vez ao dia por inalação, e foi possível observar que os animais que receberam esse antibiótico por inalação apresentaram manutenção do

peso corporal, enquanto os animais que receberam o antibiótico na água de beber tiveram redução do peso corporal.

Os resultados divergentes dos estudos podem ser explicados pela diferença na via de administração, como também pela dose e período de tratamento. Contudo vale ressaltar que essa ausência de diferença significativa do peso corporal dos camundongos entre os grupos de tratamento pode representar um aspecto favorável do nosso estudo, uma vez que o objetivo do uso de antibióticos foi tão somente a modulação da microbiota intestinal e não a promoção de alteração do peso corporal. Desta forma, os resultados encontrados não foram relacionados a mudanças do peso corporal.

A ingestão hídrica dos camundongos foi semelhante entre os grupos de estudo durante todo período de tratamento, tanto nos animais que receberam dieta normolipídica quanto nos animais que receberam dieta hiperlipídica. Desta forma, os animais que receberam antibióticos na água de beber não tiveram comprometimento da ingestão hídrica. Corroborando com esse resultado, estudo realizado por Hwang et al (96) também mostrou que a ingestão hídrica de camundongos C57BL/6J não foi comprometida quando esses animais receberam antibióticos (vancomicina 0,5 g/L e bacitracina 1 g/L) na água de beber por 8 semanas. Da mesma forma, no estudo realizado por Reikvam et al (97) em camundongos BALB/c, foi mostrado que os animais que receberam antibióticos (vancomicina 5 mg/mL, neomicina 10 mg/mL, metronidazol 10 mg/mL e anfotericina-B 0,1mg/mL) por gavagem durante 17 dias não tiveram comprometimento da ingestão hídrica.

No presente estudo, o tratamento com os antibióticos não promoveu modificação da ingestão de energia e eficiência calórica nos camundongos alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica. Similar resultado foi observado nos dois estudos já descritos anteriormente, de Murphy et al (94) e Hwang et al (96).

O tratamento com os antibióticos também não alterou a massa de diferentes depósitos de tecido adiposo (epididimal, retroperitoneal, inguinal e interescapular), nem a massa do fígado, nos camundongos alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica, com exceção da massa do TAM interescapular nos animais que receberam dieta hiperlipídica, em que houve aumento no grupo tratado com antibióticos em relação ao controle. No estudo de Hwang et al (96) foi observado que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com antibióticos não tiveram modificação da massa de diferentes depósitos de tecido adiposo

(inguinal, retroperitoneal e interescapular), mas apresentaram aumento da massa do TAB epididimal, quando comparados com o grupo que recebeu somente dieta hiperlipídica. No estudo de Norville et al (95), também não foi observada alteração da massa do fígado de camundongos receberam antibiótico.

Com a microbiota intestinal com o uso dos antibióticos, buscou-se aprofundar a relação entre a microbiota intestinal e o recrutamento de adipócitos termogênicos. Para isso, utilizamos os dois principais componentes da resposta ao frio, o agonista do receptor β 3-adrenérgico e o hormônio triiodotironina (98).

O tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico durante 5 dias, por via intraperitoneal, não promoveu diminuição significativa do peso corporal dos camundongos alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica. O fato de não termos encontrado uma diferença significativa no nosso estudo pode ser justificado pela curta duração do tratamento. Resultado semelhante foi descrito no estudo realizado por Shin et al (99) em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta normolipídica e que receberam por 7 dias o tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico (CL 316,243) na dose de 0,1 mg/kg/dia, por injeção subcutânea. A dose utilizada neste estudo foi inferior à utilizada no presente estudo, embora o tempo de tratamento tenha sido maior. Entretanto, no estudo de Warner et al (100), realizado em ratos *wistar* alimentados com dieta hiperlipídica, foi observada diminuição do peso corporal quando os animais receberam, por infusão contínua, durante 3 semanas, o agonista do receptor β 3-adrenérgico (CL 316,243) na dose de 1 mg/kg/dia. De forma semelhante, no estudo realizado por Nagase et al (101), foi observada redução do peso corporal dos camundongos C57BL/6J alimentados com dieta normolipídica e que receberam por injeção subcutânea o agonista do receptor β 3-adrenérgico (CL 316,243), por 2 semanas, na dose de 0,1 mg/kg/dia. Vale ressaltar que os estudos citados não são diretamente comparáveis ao nosso, pois o tempo de tratamento e/ou dose utilizada foram diferentes, de forma que o efeito final do agonista β 3-adrenérgico tenha sido diferente.

Durante o tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico não foi observada também diferença da quantidade de energia ingerida entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica. Entretanto observou-se uma diminuição da eficiência calórica no grupo que recebeu o agonista do receptor β 3-adrenérgico. Desta forma, esperaria-se perda de peso em relação ao controle. É possível que o tempo de tratamento não tenha sido suficiente para promover perda significativa de peso.

Entretanto, ainda que diferença de peso não tenha sido significativa, ela foi suficiente para promover redução da eficiência calórica. No estudo realizado por Warner et al (100), que envolveu tratamento com CL316,243 por 3 semanas, na dose de 1 mg/kg/dia, também não foi observada mudança da energia ingerida, em relação ao controle. Entretanto, o estudo de Susulic (71), no qual os animais receberam tratamento agudo (dose de 1 mg/kg) com o agonista do receptor β 3-adrenérgico, observou-se redução da ingestão de energia.

Em relação à massa dos depósitos de tecido adiposo (epididimal, retroperitoneal, inguinal, interescapular) e do fígado, foi observado que nos animais alimentados com dieta normolipídica e que receberam o agonista do receptor β 3-adrenérgico e antibióticos, mas não nos que receberam estes tratamentos isoladamente, houve redução da massa dos depósitos viscerais epididimal e retroperitoneal, como também da massa do depósito subcutâneo inguinal, em relação ao controle. Nenhuma alteração foi observada na massa de depósitos de tecido adiposo ou do fígado nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Alguns estudos avaliaram o efeito do uso do agonista do receptor β 3-adrenérgico, utilizado no presente estudo (CL316,243), na massa dos diferentes depósitos de tecido adiposo. No estudo realizado por Shin et al (99), não foi observada alteração da massa do tecido adiposo interescapular, inguinal e gonadal nos camundongos alimentados com dieta normolipídica e tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico (0,1 mg/kg/dia por injeção subcutânea, durante 7 dias). De forma semelhante, no estudo realizado por Warner (100) não foi observada alteração da massa do TAB epididimal, inguinal e massa do fígado, quando os animais alimentados com dieta hiperlipídica receberam o agonista do receptor β 3-adrenérgico (1 mg/kg/dia por infusão, durante 3 semanas). Diferentemente, no estudo de Yoshida et al (102), foi observada redução da massa do tecido adiposo visceral retroperitoneal e aumento do TAM interescapular nos camundongos alimentados com dieta normolipídica que receberam o agonista do receptor β 3-adrenérgico (0,1 mg/kg/dia por gavagem, durante 2 semanas). Vale ressaltar que os estudos citados não são diretamente comparáveis ao presente estudo, pois o tempo de tratamento e/ou dose utilizada foram diferentes.

O tratamento com T3 durante 3 dias, na dose de 10 μ g/dia, não modificou o peso corporal dos animais alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica.

Resultado semelhante foi observado no estudo de Luvizotto et al (103), embora com dose total inferior de T3, quando comparada à do presente estudo. Os autores observaram que ratos Wistar alimentados com dieta normolipídica e tratados com T3 na dose de 0,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso durante 4 semanas, por via intraperitoneal, não apresentaram alteração do peso corporal quando comparados ao controle. Entretanto, Alvarez-Crespo et al (104) observaram que a administração intracerebroventricular de T3, na dose de 8 ng/dia, durante 6 dias, a camundongos C57BL/6 alimentados com dieta normolipídica resultou em diminuição do peso corporal. Não foi encontrado estudo com esquema de tratamento com T3 semelhante ao do presente estudo que tenha descrito o efeito da dose utilizada sobre o peso corporal.

Os animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados T3 não apresentaram aumento da ingestão de energia e menor redução da eficiência calórica. No estudo de Luvizotto et al (103) também não foi observado alteração do consumo alimentar de animais tratados com T3. Entretanto, o aumento da ingestão alimentar foi observado no estudo de Alvarez-Crespo (104), como também no estudo de Cao et al (105). Neste último, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com T3 (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ duas vezes por semana durante 3 semanas) apresentaram aumento da ingestão de energia e também do gasto energético.

Em relação à adiposidade, os animais alimentados com dieta normolipídica e tratados com T3 apresentaram redução da massa do tecido adiposo visceral epididimal e manutenção da massa dos demais depósitos avaliados (retroperitoneal e inguinal). Os animais que receberam antibióticos e T3 apresentaram aumento da massa do TAM interescapular. No grupo alimentado com dieta hiperlipídica, foi observado aumento na massa do TAM interescapular em resposta ao tratamento com T3 isoladamente e com antibióticos. A redução da massa adiposa branca visceral é consistente com os benefícios do T3 sobre a homeostase metabólica. Entretanto, este efeito não é observado em todos os estudos que envolveram tratamento com T3. Cao et al (105) e Luvizotto et al (103) não observaram alteração da massa de gordura, embora seus resultados não sejam diretamente comparáveis com os do presente estudo em razão dos diferentes esquemas posológicos empregados. Lin et al (79), por sua vez, observaram-se que o tratamento com o agonista seletivo do THR beta reduziu massa de gordura, e no estudo de Alvarez-

Crespo et al (104) foi observado aumento da massa do TAM interescapular em resposta ao tratamento com T3.

A dose que utilizamos de T3 não foi suficiente para promover mudanças na massa do fígado. Entretanto, no estudo realizado por Malik et al (106), em que camundongos foram tratados com dose mais elevada de T3 (4 mg/kg) durante o mesmo período de 3 dias, foi observado aumento na massa do fígado, sugerindo a influência deste hormônio sobre o tecido hepático.

A termogênese adaptativa induzida pelo frio ocorre nos adipócitos termogênicos, marrons e bege. Os mecanismos envolvidos na ativação da termogênese nestas células pelo frio envolvem, classicamente, o aumento da atividade simpática, com liberação de catecolaminas, e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (107). O papel da microbiota intestinal na termogênese adaptativa induzida pelo frio foi previamente caracterizado por Chevalier et al (11) porém, para nosso conhecimento, o efeito da microbiota intestinal sobre os dois componentes principais da ativação deste processo, a sinalização β 3-adrenérgica pelas catecolaminas e a ação do hormônio tireoidiano, avaliados individualmente, não foi caracterizado. Embora o efeito final destes componentes seja o mesmo, de indução da termogênese, as vias de sinalização por cada um deles é específica. Desta forma, o presente estudo buscou dissecar o efeito da modulação da microbiota intestinal sobre cada um dos componentes da resposta a frio. Para isso, foi avaliada a resposta do TAB e do TAM ao T3 e à sinalização β 3-adrenérgica, na ausência ou presença da modulação da microbiota intestinal com uso de antibióticos, utilizando-se como desfechos a expressão de transcritos de genes relacionados à termogênese. Esta investigação, além disso, foi conduzida em diferentes cenários de dieta, normolipídica e hiperlipídica, uma vez que a dieta representa importante influência sobre a composição da microbiota intestinal havendo, assim, possibilidade de a modulação de sua composição nestes diferentes contextos promover mudanças diferentes nestes marcadores.

No TAB inguinal e epididimal, como também no TAM interescapular, não houve diferença da expressão de *Ucp1* em resposta à modulação da microbiota intestinal com antibióticos, nos dois cenários de dieta. Entretanto, no estudo realizado por Suarez-Zamorano et al (10), observou-se que animais alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica e tratados com coquetel de antibióticos composto por neomicina (100 μ g/mL), estreptomicina (50 μ g/mL), penicilina (100

U/mL), vancomicina (50 µg/mL), metronidazol (100 µg/mL), bacitracina (1 mg/mL), ciprofloxacina (125 µg/mL), ceftazidima (100 µg/mL) e gentamicina (170 µg/mL), administrados na água de beber durante 40 dias, apresentaram aumento da expressão de *Ucp1* no TAB inguinal e perigonadal, mais acentuado no primeiro depósito. Estes dados sugerem que algumas bactérias da microbiota intestinal, subrepresentadas após o tratamento com os antibióticos, podem inibir o recrutamento do adipócito bege. O resultado divergente encontrado no presente estudo, em que não foi observada indução significativa da expressão de *Ucp1* no tecido adiposo, pode estar relacionada ao coquetel de antibióticos que utilizamos (vancomicina 0,5 g/L e ciprofloxacina 2 g/L), diferente da ampla variedade de antibióticos utilizados no estudo de Suárez-Zamorano (10), que foi capaz de promover depleção da microbiota intestinal, e não provavelmente apenas modulação da microbiota, como no nosso estudo.

Quando tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico, os animais apresentaram aumento da expressão relativa de *Ucp1* no TAB subcutâneo inguinal e TAB visceral epididimal, nos cenários de dieta normolipídica e hiperlipídica. Este achado é esperado e foi demonstrado anteriormente. Koza et al (108) avaliaram camundongos alimentados com dieta rica em CL316,243 após 14 semanas e observaram aumento da expressão de *Ucp1* no TAB subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal. Em concordância, no estudo realizado por Sell et al (109), no qual animais alimentados com dieta normolipídica receberam o agonista do receptor β 3-adrenérgico (1 mg/kg) por bomba de infusão durante 14 dias, foi observado aumento da expressão relativa de *Ucp1* no TAB subcutâneo inguinal e TAB visceral retroperitoneal.

Em relação ao TAM interescapular, nos animais alimentados com dieta normolipídica e tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico não houve modificação da expressão de *Ucp1*. Resultado semelhante foi observado no estudo de Sell et al (109). Por outro lado, os animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico apresentaram aumento da expressão de *Ucp1*, também em concordância com dados de estudos anteriores, como o de Koza et al (108).

O tratamento com T3, como esperado, induziu aumento da expressão de *Ucp1* no TAB inguinal e epididimal, nos cenários de dieta normolipídica e

hiperlipídica. Estudos anteriores descreveram resultados semelhantes, como os de Alvarez-Crespo(104) e Lin et al (79), em que animais tratados com T3 ou agonista seletivo do TR beta, respectivamente, apresentaram aumento da expressão de *Ucp1* no TAB inguinal. No nosso estudo, no TAM não foi observada nenhuma alteração da expressão de *Ucp1* em resposta ao T3, nos dois cenários de dieta, também de forma semelhante a resultados de estudos anteriores, como o de Cao et al (105).

A modulação da microbiota intestinal com vancomicina e ciprofloxacina, no presente estudo, produziu efeitos variáveis sobre a resposta aos dois estímulos termogênicos nos diferentes depósitos de tecido adiposo. No TAM, o uso de antibióticos não modificou a expressão de *Ucp1* em resposta à estimulação β 3-adrenérgica ou ao T3, nos dois cenários de dieta. No TAB inguinal e epididimal, a modulação da microbiota intestinal com uso de antibióticos acentuou indução da expressão relativa de *Ucp1* pela estimulação β 3-adrenérgica, tanto nos animais alimentados com dieta normolipídica quanto naqueles alimentados com dieta hiperlipídica. Estes dados sugerem que a modulação da microbiota intestinal possa acentuar o amarronzamento do TAB em resposta ao estímulo clássico para este processo, a sinalização β 3-adrenérgica, independentemente da composição inicial da microbiota intestinal modulada pela dieta. É possível que este achado seja devido à diminuição da representação de determinada(s) cepa(s) de bactéria(s) pelo tratamento com antibióticos, ou mesmo aumento da representação de determinada(s) cepa(s) não influenciada pelo tratamento. Não é possível, também, descartar efeito direto do antibiótico no tecido adiposo, especificamente da ciprofloxacina, que é absorvida para a circulação sistêmica após a administração oral (110). O protocolo experimental empregado no presente estudo, entretanto, não permite diferenciar estas possibilidades.

Interessantemente, o efeito da modulação da microbiota intestinal sobre a resposta do tecido adiposo ao T3 foi contrário ao observado sobre a resposta à estimulação β 3-adrenérgica. No TAB inguinal e epididimal, a modulação da microbiota intestinal atenuou a indução de *Ucp1* pelo T3 nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, porém não naqueles alimentados com dieta normolipídica. Estes dados sugerem, portanto, que o efeito da modulação da microbiota intestinal sobre a expressão do marcador de termogênese *Ucp1* seja dependente da composição inicial da microbiota, determinada pela dieta.

Até o presente momento, para nosso conhecimento, nenhum estudo havia avaliado o efeito da modulação da microbiota intestinal sobre o efeito dos dois principais componentes da resposta ao frio (estimulação β 3-adrenérgica e hormônio tireoidiano) no tecido adiposo, embora a relação da microbiota intestinal com a resposta ao frio tenha sido caracterizada recentemente. Chevalier et al (11) mostraram que camundongos expostos ao frio (temperatura de 6°C por 10 dias) apresentaram alteração da composição da microbiota intestinal e estabeleceram relação de causa e efeito desta mudança com o amarronzamento do tecido adiposo branco. Os pesquisadores observaram que a transferência da microbiota intestinal dos animais expostos ao frio para camundongos isentos de germes promoveu, nestes últimos, aumento da expressão de *Ucp1* no tecido adiposo inguinal e perigonadal destes últimos, o que não foi observado em animais transplantados com a microbiota intestinal de animais mantidos em temperatura ambiente.

No presente estudo, foi investigada também a expressão de outros genes relacionados à termogênese e amarronzamento no TAB, incluindo aqueles que codificam o PGC1- α e a PRDM16. A modulação da microbiota intestinal não modificou a expressão de *Ppargc1a* no TAB inguinal e epididimal, tanto no cenário de dieta normolipídica quanto no de dieta hiperlipídica. Diferentemente, no estudo de Suarez-Zamorano et al (10) a expressão de *Ppargc1a* no TAB inguinal e perigonadal foi maior nos animais que receberam o coquetel de antibióticos. Entretanto, este estudo não é diretamente comparável ao nosso em razão da diferença do esquema de antibióticos utilizados nos dois estudos; o estudo de Suarez-Zamorano et al (10), em que foi utilizada maior variedade de antibióticos, promoveu depleção da microbiota intestinal. No presente estudo, embora a composição da microbiota não tenha sido analisada, é possível que tenha havido somente modulação de sua composição.

Em relação a expressão de *Prdm16*, no TAB inguinal de animais alimentados com dieta normolipídica, foi observada redução em resposta ao tratamento com antibióticos, isoladamente, porém não no TAB epididimal. Também não foram observadas mudanças em resposta aos antibióticos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, em nenhum dos depósitos de tecido adiposo. No estudo de Suarez-Zamorano et al (10), o coquetel com ampla variedade de antibióticos para promoção de depleção da microbiota intestinal não modificou a expressão de *Prdm16* em nenhum dos depósitos de tecido adiposo analisados.

De maneira geral, os resultados do nosso estudo sugeriram que a modulação da microbiota intestinal por antibióticos, isoladamente, não foi capaz de promover alterações significativas da expressão dos genes relacionados à termogênese que foram avaliados (aqueles que codificam a *Ucp1*, *Ppargc1a* e *Prdm16*).

O tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico não modificou a expressão de *Ppargc1a* no TAB inguinal e epididimal, no cenário de dieta normolipídica, porém aumentou a expressão deste transcrito no TAB inguinal e de forma menos acentuada no TAB epididimal. A razão para esta diferença entre a resposta dos animais alimentados com os diferentes tipos de dieta não é clara, mas pode estar relacionada ao tempo de tratamento com o agonista β 3-adrenérgico, que talvez precisasse ser mais prolongado. No estudo realizado por Sell et al (109), animais alimentados com dieta normolipídica que foram tratados com o mesmo agonista do receptor β 3-adrenérgico, na mesma dose (1 mg/kg/d), porém durante por 14 dias, apresentaram aumento da expressão de *Ppargc1a* somente no TAB inguinal e não no epididimal. Resultado semelhante foi observado no estudo de Koza et al (108), no qual os animais alimentados com dieta suplementada com o agonista do receptor β 3-adrenérgico por 14 semanas apresentaram aumento da expressão de *Ppargc1a* no TAB inguinal e nenhuma alteração foi observada no TAB retroperitoneal.

A modulação da microbiota intestinal com antibióticos não modificou a expressão de *Ppargc1a* no TAB inguinal e epididimal em resposta à ação do agonista do receptor β 3-adrenérgico, no cenário de dieta normolipídica. Entretanto nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, foi observada acentuação do efeito da estimulação β 3-adrenérgico sobre a expressão deste transcrito no TAB subcutâneo inguinal, à semelhança do que ocorreu com a expressão de *Ucp1*. Não foi observado efeito da modulação da microbiota sobre a resposta β 3-adrenérgica no TAB epididimal.

O tratamento com o T3 aumentou a expressão de *Ppargc1a* no TAB inguinal dos animais alimentados com dieta normolipídica, porém não modificou sua expressão no TAB epididimal. Nos animais que receberam dieta hiperlipídica, houve indução discreta, porém não significativa, da expressão de *Ppargc1a* no TAB inguinal em resposta ao T3 isoladamente. No TAB epididimal, o T3 induziu de forma discreta porém significativa a expressão de *Ppargc1a*. A expressão de *Ppargc1a* em

resposta ao hormônio tireoidiano parece depender do tempo de tratamento com o hormônio e também da isoforma do receptor de hormônio tireoidiano ativada. No estudo realizado por Cao et al (105), a expressão de *Ppargc1a* aumentou no TAB inguinal de camundongos tratados com T3 por período mais prolongado (200 µg/kg por 3 semanas), enquanto no estudo realizado por Lin et al (79) os animais que receberam agonista sintético seletivo do THR beta (0,3 mg/kg por 21 dia) não apresentaram modificação da expressão de *Ppargc1a* no TAB subcutâneo.

A modulação da microbiota intestinal não influenciou o efeito do T3 sobre a expressão de *Ppargc1a* no TAB inguinal e epididimal nos animais alimentados com dieta normolipídica. Diferentemente, nos animais alimentados com dieta hiperlipídica houve acentuação do efeito do T3 no TAB subcutâneo inguinal pela modulação da microbiota intestinal, resultado que não foi observado no TAB visceral epididimal. Este achado no TAB inguinal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica é divergente daquele observado em relação à expressão de *Ucp1*, cuja indução pelo T3 no TAB foi reduzida pela modulação da microbiota intestinal. Este resultado não era esperado, considerando que os genes que codificam a UCP1 e o PGC1- α são em geral regulados de forma semelhante.

A expressão de *Prdm16* foi diminuída pelo agonista do receptor β 3-adrenérgico no TAB inguinal, no cenário de dieta normolipídica, porém não no TAB epididimal. Também não foi observada modificação deste transcrito no TAB inguinal e epididimal nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Estes achados são semelhantes aos de Gavaldà-Navarro et al (111), em que animais alimentados com dieta normolipídica e tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico (1 mg/kg por 8 dias) apresentaram redução da expressão de *Prdm16* no TAB inguinal. Entretanto no estudo de Yao et al (112) camundongos alimentados com dieta normolipídica e tratados com o agonista do receptor β 3-adrenérgico (1 mg/kg por 5 dias) apresentaram aumento da expressão de *Prdm16* no TAB epididimal. Desta forma, essa relação entre agonista do receptor β 3-adrenérgico e expressão de *Prdm16* ainda não está clara.

A modulação da microbiota intestinal por antibióticos não modificou a ação do agonista do receptor β 3-adrenérgico sobre a expressão de *Prdm16* nos depósitos de TAB subcutâneo e visceral, nos dois cenários de dieta avaliados. Esses resultados sugerem que houve amarronzamento do TAB inguinal, indicado pela expressão de

Ucp1, sem haver modificação da transcrição do gene que codifica a PRDM16, como foi observado anteriormente no estudo de Suarez (10). É possível, então, o envolvimento de mecanismos pós-transcricionais sobre a PRMD16, como o que é observado, por exemplo, em relação ao amarronzamento do TAB promovido por agonistas de PPAR γ (113).

O tratamento do T3 não modificou a expressão de *Prdm16* no TAB inguinal e epididimal, no cenário de dieta normolipídica. Nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, também não houve mudança no TAB inguinal, porém no TAB epididimal o T3 induziu a expressão de *Prdm16*. No estudo realizado por Lin et al (79) os animais que receberam o agonista sintético do THR beta (0,3 mg/kg por 21 dias) apresentaram aumento da expressão de *Prdm16* no TAB subcutâneo e diminuição da expressão de *Prdm16* no TAB epididimal. A diferença do resultado pode ser justificada pela diferença no tipo de linhagem utilizada. Em nosso estudo, utilizamos camundongos C57BL/6 e no estudo de Lin et al (79) foram utilizados camundongos geneticamente modificados *ob/ob*. Além disso, o tempo de tratamento e a dose utilizada por Lin et al foram superiores aos utilizados no presente estudo. A modulação da microbiota intestinal diminuiu o efeito do T3 sobre a expressão de *Prmd16* no depósito de TAB epididimal, no cenário de dieta hiperlipídica, à semelhança do que foi observado em relação à expressão de *Ucp1*.

Nossos achados, em conjunto, sugerem que a modulação da microbiota intestinal com antibióticos apresentou, sobretudo em animais alimentados com dieta hiperlipídica, efeito divergente sobre a indução de *Ucp1* no TAB em resposta à estimulação β 3-adrenérgica e ao T3, na medida em que acentuou o efeito do agonista β 3-adrenérgico porém reduziu o efeito do T3. Entretanto, alterações semelhantes não foram observadas sobre a expressão de *Ppargc1a* e *Prdm16*. Os mecanismos envolvidos na relação entre a microbiota intestinal e a termogênese foram previamente explorados, porém ainda não estão claros. No estudo de Suarez-Zamorano et al (10), observou-se aumento da expressão das citocinas do tipo 2, produzidas por macrófagos alternativamente ativados (fenótipo M2) em resposta ao tratamento com antibióticos, fato esse não observado no TAM, sugerindo assim uma associação dos macrófagos M2 com o recrutamento do adipócito bege. Entretanto, estes dados não foram confirmados em outro estudo (114). Estes achados, contudo, não contribuem para compreender nossos achados de efeitos divergentes da

modulação da microbiota sobre o efeito da estimulação β 3-adrenérgico e do T3. Para investigar este aspecto, exploramos a expressão de genes relacionados à ação celular do hormônio tireoidiano, no TAB, especificamente a proteína transportadora MCT8, a desiodinase tipo 2 e as isoformas do receptor de hormônio tireoidiano.

A desiodinase tipo 2 desempenha um papel importante na termogênese, no tecido adiposo. A sinalização pelas catecolaminas, mediada pelo receptor β 3-adrenérgico, resulta em ativação da proteína cinase A e aumento do conteúdo intracelular de AMPc. Isto, por sua vez, regula positivamente a expressão do gene que codifica a desiodinase tipo 2. A ação desta enzima promove conversão intracelular do T4 em T3 e o T3 regula ativamente a produção de UCP1, enzima efetora da termogênese no adipócito (75). No nosso estudo, o tratamento com antibióticos, isoladamente, não modificou a expressão do RNAm do gene que codifica a desiodinase tipo 2 no tecido adiposo branco inguinal ou epididimal, em animais alimentados com dieta normo ou hiperlipídica. Entretanto, naqueles alimentados com dieta normolipídica o tratamento com antibióticos reduziu significativamente a atividade da enzima desiodinase 2 no TAB subcutâneo axilar e, naqueles que receberam dieta hiperlipídica, houve tendência não significativa de redução. Esses resultados sugerem que a microbiota intestinal possa modular a termogênese adaptativa no tecido adiposo por um mecanismo diferente dos propostos até o momento, envolvendo a modulação da atividade da desiodinase tipo 2 e, assim, a ativação intracelular do hormônio tireoidiano. Entretanto, o desenho do presente estudo não permite discriminar se este efeito é decorrente da ação de uma espécie bacteriana específica, nem elucidar os mecanismos envolvidos neste efeito.

O efeito dos diferentes estímulos termogênicos, sinalização β 3-adrenérgica e T3, sobre a expressão do de *Dio2* no TAB, também foi investigado. Nos animais alimentados com dieta normolipídica, houve indução da expressão relativa em resposta à sinalização β 3-adrenérgica, mais acentuada no TAB inguinal, porém também observada no TAB epididimal. Houve, ainda, tendência de aumento do efeito do agonista β 3-adrenérgico sobre a indução deste transcrito no grupo tratado com antibióticos. Nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, o tratamento com o agonista β 3-adrenérgico induziu de forma significativa a expressão de *Dio2* somente no TAB inguinal, e este efeito foi significativamente acentuado pelo tratamento com antibióticos. No TAB inguinal, só foi observada indução significativa

da expressão de *Dio2* em resposta ao co-tratamento com o agonista β 3-adrenérgico e antibióticos. A indução de *Dio2* pela sinalização β 3-adrenérgica é bem estabelecida. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores, incluindo o de Jong et al (115), no qual camundongos alimentados com dieta normolipídica e que receberam o agonista do receptor β 3-adrenérgico CL316,243 (1 mg/kg, duas doses) apresentaram aumento da expressão de *Dio2* no TAB inguinal e epididimal. A influência da microbiota sobre o efeito da sinalização β 3-adrenérgica na indução de *Dio2*, para nosso conhecimento, não foi descrita até o momento, e os resultados em relação a este transcrito são comparáveis aos observados em relação a outro marcador termogênico, o gene que codifica a UCP1, reforçando o efeito de a modulação da microbiota acentuar a ação da sinalização β 3-adrenérgica.

Em relação ao tratamento com T3, a expressão de *Dio2* não foi modificada significativamente no TAB inguinal no cenário de dieta normolipídica, embora tenha havido tendência de sua indução pelo T3, não modificada pelo uso de antibióticos. No TAB epididimal, foi observada indução significativa de sua expressão em resposta ao T3, efeito significativamente atenuado pelo co-tratamento com antibióticos. No cenário de dieta hiperlipídica, o T3 induziu a expressão de *Dio2* no TAB inguinal, porém não de forma significativa; entretanto, seu efeito foi acentuado pelo co-tratamento com antibióticos. No TAB epididimal, a indução da *Dio2* pelo T3 foi significativa, embora menos acentuada, e não se modificou pelo tratamento com antibióticos. O efeito do T3 sobre a expressão do transcrito do gene que codifica a desidrinase tipo 2 foi previamente demonstrada, e parecer decorrer da ativação do $\text{THR}\beta$. No estudo de Lin et al (79), também foi observado aumento da expressão de *Dio2* em camundongos tratados com o agonista sintético do TR beta. Entretanto, não encontramos estudos que tenham explorado o efeito da microbiota intestinal sobre este transcrito. A expectativa era de efeito semelhante ao observado em relação à expressão de *Ucp1*, considerando que o gene da desidrinase tipo 2 representa um marcador de termogênese. Entretanto, no presente estudo, o efeito dos antibióticos sobre a resposta ao T3 como estímulo termogênico foi diferente conforme o padrão de dieta (e, possivelmente, o padrão específico de mudanças da composição da microbiota intestinal em resposta aos antibióticos) e o depósito de TAB.

O tecido adiposo expressa as duas isoformas do receptor do hormônio tireoidiano, THR alfa e THR beta. Ambas estão envolvidas na resposta a estímulos termogênicos, porém em mecanismos diferentes. A isoforma alfa está implicada na resposta às catecolaminas e a beta, na indução da expressão do gene que codifica a expressão de UCP1 (75, 116). No presente estudo, foi investigada a expressão de *Thra* e *Thrb* no TAB inguinal e epididimal.

No TAB inguinal, a expressão das duas isoformas não foi modificada pela sinalização β 3-adrenérgica ou pelo T3 nos diferentes cenários de dieta e a modulação da microbiota intestinal não modificou a resposta a estes dois estímulos. Desta forma, os efeitos da modulação da microbiota sobre a expressão do gene que codifica a UCP1, cujo promotor é regulado pelo THR beta, ou o efeito sobre a resposta ao agonista β 3-adrenérgico, que é dependente do THR alfa, não se explicaria por mudança da expressão dos dois receptores no TAB inguinal.

No TAB epididimal, nos dois cenários de dieta, o tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico promoveu diminuição da expressão de *Thra* e *Thrb*, e este efeito não foi modificado pela modulação da microbiota intestinal. O tratamento com T3 não modificou a expressão de *Thra* e *Thrb*. Entretanto, a modulação da microbiota intestinal, apenas no cenário de dieta hiperlipídica, atenuou a expressão de *Thra* e *Thrb* nos animais tratados com T3.

O tratamento isolado com antibióticos, além disso, modificou a expressão destes transcritos. No TAB inguinal, no cenário de dieta hiperlipídica, a expressão de *Thrb* foi aumentada pelo tratamento isolado com antibióticos. No TAB epididimal, apenas no cenário de dieta hiperlipídica, os animais tratados com antibióticos apresentaram diminuição da expressão de *Thra*, porém não de *Thrb*. No TAB epididimal, no cenário de dieta normolipídica, contudo, os animais que receberam somente antibióticos apresentaram diminuição da expressão de *Thrb*. Estes dados, em conjunto, sugerem que em condições basais a microbiota possa influenciar, por mudança da expressão de *Thra* e *Thrb*, a ação do hormônio tireoidiano no TAB, embora em condições de ação de estímulos termogênicos este efeito não seja observado.

Como forma de investigar se a interferência com a ação do T3 no TAB estaria relacionada a uma menor captação celular deste hormônio em resposta à modulação da microbiota intestinal, foi analisada a expressão do gene que codifica o

transportador de hormônio tireoidiano MCT8, ou transportador de monocarboxilato 8. Esta é uma proteína transmembrana que atua como transportador específico para o T3, sendo responsável pelo transporte do T3 para células alvo, além de efetuar o transporte de hormônios tireoidianos para fora da célula folicular tireoidiana (117). No presente estudo, no TAB inguinal, nos dois cenários de dieta, a expressão de *Sc16a2* não foi modificada quando os animais foram tratados com antibióticos e/ou agonista do receptor β 3-adrenérgico ou T3. Embora não tenha sido analisado diretamente o transporte de hormônio tireoidiano, estes achados sugerem que a microbiota intestinal não modifique o transporte do hormônio tireoidiano no TAB inguinal.

No TAB epididimal, no cenário de dieta normolipídica, o tratamento com antibióticos promoveu indução da expressão de *Sc16a2*. Entretanto, não houve mudança em resposta ao agonista do receptor β 3-adrenérgico ou ao T3, isoladamente ou na presença de antibióticos. Este achado sugere que em condições basais a microbiota intestinal possa influenciar o transporte de hormônio tireoidiano para o adipócito branco epididimal, porém este efeito não é observado quando da ação de estímulos termogênicos. Ainda neste depósito, no cenário de dieta hiperlipídica, o tratamento com o agonista do receptor β 3-adrenérgico diminuiu a expressão de *Sc16a2* e este efeito não foi influenciado pela modulação da microbiota intestinal. Diferentemente, o tratamento com T3 promoveu aumento da expressão de *Sc16a2* e este efeito foi atenuado pelo co-tratamento com antibióticos. Desta forma, é possível que no adipócito epididimal de animais alimentados com dieta hiperlipídica a modulação da microbiota intestinal possa modificar a resposta a ação do hormônio tireoidiano por alterar seu transporte para o meio intracelular, em condições de estimulação por este hormônio.

Cabe ressaltar que todos os resultados relativos à expressão de genes relacionados à termogênese e à ação do hormônio tireoidiano não permitem conclusões definitivas a respeito da influência da microbiota intestinal sobre a resposta aos estímulos termogênicos estudados, uma vez que no presente estudo foi avaliada apenas a expressão de transcritos destes genes e não foi realizada avaliação funcional das proteínas por eles codificadas.

Como forma de caracterizar o eixo tireoidiano desses animais, foi dosada a concentração sérica do hormônio estimulante da tireoide (TSH). O TSH é expresso

na hipófise anterior e regulado negativamente pelo hormônio tireoidiano, de forma que sua concentração reflete a ação do hormônio tireoidiano, ainda que apenas na hipófise (118). Foi observada tendência de aumento da concentração sérica de TSH nos animais alimentados com dieta normolipídica e tratados com antibióticos, mas nenhum dos grupos apresentou concentração sérica de TSH abaixo ou acima da faixa de referência. Esses dados sugerem que o uso de antibióticos não modificou significativamente a atividade do eixo tireoidiano e que, possivelmente, os efeitos da modulação da microbiota intestinal sobre a expressão de genes termogênicos em resposta a estímulos termogênicos, observados no estudo, tenham sido devido a efeitos específicas nos adipócitos, sobre a ação do hormônio tireoidiano.

A concentração de TSH foi avaliada também nos animais tratados, por curto período, com o agonista β 3-adrenérgico ou com o T3. Até o presente momento, para o nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou o efeito do agonista do receptor β 3-adrenérgico sobre as concentrações séricas de TSH. Embora a estimulação β 3-adrenérgica resulte em aumento das concentrações intracelulares de T3, no tecido adiposo, não é possível prever se isto ocorreria no tireotrofo, célula hipofisária responsável pela produção de TSH, ou no neurônio hipotalâmico produtor do hormônio liberador de tireotrofina, que poderia estimular a secreção de TSH. Embora o receptor β 3-adrenérgico seja expresso no cérebro e no hipotálamo (119, 120), para nosso conhecimento não foi caracterizada sua ação na regulação do eixo tireotrófico. Não é possível, também, descartar eventual influência do receptor β 3-adrenérgico, expresso periféricamente, no eixo tireotrófico e, assim, na secreção de TSH. Entretanto, o tratamento por curto período, em nosso estudo, não promoveu mudança das concentrações séricas deste hormônio.

Esperava-se, contudo, diminuição das concentrações séricas de TSH em resposta ao tratamento com T3, em razão do efeito bem estabelecido de retroalimentação negativa da secreção de TSH pelo T3, via ativação do $\text{THR}\beta$ hipofisário (107). Este efeito não foi observado e é possível que este achado tenha sido devido ao curto tempo de tratamento, que pode não ter sido suficiente para promover essa alteração. Em concordância com esta possibilidade, no estudo realizado por Kong et al (121), foi observado que o tratamento agudo de T3 (4,5 nmol/kg) não promoveu alteração nas concentrações séricas de TSH, entretanto o

tratamento crônico de T3 (4,5 nmol/kg por 5 dias) promoveu diminuição das concentrações de TSH.

Como limitações do estudo, destacam-se o pequeno número amostral e a predominância das análises baseadas em expressão gênica, que podem não se correlacionar diretamente com a expressão proteica e, também, atividade das proteínas cujos transcritos foram analisados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu concluir que em camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta normolipídica:

- A estimulação β 3-adrenérgica ou por T3, isoladamente, não modificaram o ganho de peso, ingestão de energia, eficiência calórica, ingestão hídrica, e estes efeitos não foram modificados na presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos;
- A estimulação β 3-adrenérgica, isoladamente, reduziu a massa do TAB epididimal e retroperitoneal e não modificou a massa do TAB inguinal e do TAB marrom interescapular; em presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos, houve redução da massa do TAB inguinal e não houve modificação dos demais efeitos;
- A estimulação por T3, isoladamente, reduziu a massa do TAB epididimal e não modificou a massa do TAB retroperitoneal, TAB inguinal e TAM interescapular; em presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos, houve aumento da massa do TAM interescapular e não houve modificação dos demais efeitos;
- A estimulação β 3-adrenérgica ou por T3, isoladamente, não modificaram a massa do fígado, e este efeito não foi modificado na presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos;
- A estimulação β 3-adrenérgica ou por T3, isoladamente, aumentaram a expressão de *Ucp1* no TAB epididimal e inguinal, porém não no TAM interescapular. Em presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos, houve acentuação da indução de *Ucp1* em resposta à estimulação β 3-adrenérgica, porém não houve modificação dos demais efeitos;
- Não houve influência significativa da modulação da microbiota intestinal por antibióticos sobre a expressão de outros genes relacionados à termogênese (transcritos *Ppargc1a*, *Prdm16*, *Dio2*) em resposta à estimulação β 3-adrenérgica ou T3 no TAB inguinal e epididimal;
- A estimulação β 3-adrenérgica e o T3 não modificaram de forma expressiva a transcrição dos genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano (*Sc16a2*,

Thra e *Thrb*), e não houve modificação destes efeitos em presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos;

- A modulação da microbiota com antibióticos reduziu a atividade da desidrogenase tipo 2 no TAB subcutâneo axilar;
- A modulação da microbiota não modificou a concentração sérica de TSH basal ou após estimulação β 3-adrenérgica ou por T3.

Em camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica:

- A estimulação β 3-adrenérgica ou por T3, isoladamente, não modificaram o ganho de peso, ingestão de energia, eficiência calórica, ingestão hídrica, e estes efeitos não foram modificados na presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos;
- A estimulação β 3-adrenérgica e o T3, isoladamente, não modificaram a massa de TAB epididimal, retroperitoneal e inguinal, e estes efeitos não foram modificados pela modulação da microbiota intestinal por antibióticos;
- A estimulação β 3-adrenérgica, isoladamente, não modificou a massa de TAM interescapular e o T3, isoladamente, aumentou a massa deste depósito. Estes efeitos não foram modificados pela modulação da microbiota intestinal por antibióticos;
- A estimulação β 3-adrenérgica ou por T3, isoladamente, não modificaram a massa do fígado, e este efeito não foi modificado na presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos;
- A estimulação β 3-adrenérgica e por T3, isoladamente, aumentaram a expressão de *Ucp1* no TAB epididimal e inguinal. Em presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos, houve acentuação da indução de *Ucp1* em resposta à estimulação β 3-adrenérgica, e diminuição da indução induzida por T3;
- A estimulação β 3-adrenérgica aumentou e por T3 não modificou a expressão de *Ucp1* no TAM interescapular; estes efeitos não foram modificados na presença de modulação da microbiota por antibióticos;
- No TAB inguinal, houve acentuação da indução de *Ppargc1a* e *Dio2* pela estimulação β 3-adrenérgica e pelo T3 na presença de modulação da microbiota por antibióticos; no TAB epididimal a indução destes transcritos pela estimulação

β 3-adrenérgica e pelo T3 não foi modificada pela presença de modulação da microbiota por antibióticos;

- No TAB epididimal, houve diminuição da indução de *Prmd16* pelo T3 na presença de modulação da microbiota por antibióticos; não houve modificação da resposta à estimulação β 3-adrenérgica neste depósito e não houve modificação da expressão de *Prmd16* em resposta à estimulação β 3-adrenérgica ou ao T3 no TAB inguinal, na presença de modulação da microbiota por antibióticos;
- A estimulação β 3-adrenérgica e o T3 não modificaram de forma expressiva a transcrição dos genes relacionados à ação do hormônio tireoidiano (*Sc16a2*, *Thra* e *Thrb*), e não houve modificação destes efeitos em presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos;
- A modulação da microbiota com antibióticos resultou em tendência de redução da atividade da desidrinase tipo 2 no TAB subcutâneo axilar;
- A modulação da microbiota não modificou a concentração sérica de TSH basal ou após estimulação β 3-adrenérgica ou por T3.

8 CONCLUSÃO

A modulação da microbiota intestinal com antibióticos não modificou a expressão de genes relacionados à termogênese e ação do hormônio tireoidiano no TAB ou no TAM, em condições basais ou não estimuladas, embora tenha reduzido a atividade da desidrodinase tipo 2 no TAB subcutâneo. Entretanto, apresentou efeito divergente sobre a indução de *Ucp1* no TAB em resposta à estimulação β 3-adrenérgica e ao T3, na medida em que acentuou o efeito do agonista β 3-adrenérgico porém reduziu o efeito do T3. Contudo, alterações semelhantes não foram observadas sobre a expressão de transcritos de outros genes relacionados à termogênese, como *Dio2*, *Ppargc1a* e *Prdm16*.

REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:i-xii, 1-253.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Obesidade. Ministério da Saúde. 2006.
3. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
4. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(1):58-65.
5. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-23.
6. Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee KE, et al. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(7):736-44.
7. Everard A, Cani PD. Gut microbiota and GLP-1. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(3):189-96.
8. Parekh PJ, Arusi E, Vinik AI, Johnson DA. The role and influence of gut microbiota in pathogenesis and management of obesity and metabolic syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:47.
9. Kim SH, Plutzky J. Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J*. 2016;40(1):12-21.
10. Suarez-Zamorano N, Fabbiano S, Chevalier C, Stojanovic O, Colin DJ, Stevanovic A, et al. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Med*. 2015;21(12):1497-501.
11. Chevalier C, Stojanovic O, Colin DJ, Suarez-Zamorano N, Tarallo V, Veyrat-Durebex C, et al. Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell*. 2015;163(6):1360-74.

12. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252-63.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Glossário Temático Alimentação e Nutrição. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília - DF: Ministério da Saúde 2007.
14. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamento familiar. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos. Brasil. Rio de Janeiro. 2011.
15. VIGITEL. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Excesso de peso e obesidade. Brasília. 2016.
16. WHO. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. Facts about overweight and obesity. 2017.
17. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
18. Sammons MF, Price DA. Modulation of adipose tissue thermogenesis as a method for increasing energy expenditure. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(2):425-9.
19. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(8):875-88.
20. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006;55(6):1537-45.
21. Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab*. 2015;22(4):546-59.
22. Young P, Arch JR, Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett*. 1984;167(1):10-4.
23. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
24. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell*. 2014;156(1-2):304-16.
25. Keipert S, Jastroch M. Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(7):1075-82.

26. Enerback S. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med.* 2009;360(19):2021-3.
27. Tatsumi M, Engles JM, Ishimori T, Nicely O, Cohade C, Wahl RL. Intense (18)F-FDG uptake in brown fat can be reduced pharmacologically. *J Nucl Med.* 2004;45(7):1189-93.
28. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(2):E444-52.
29. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1509-17.
30. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1500-8.
31. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1518-25.
32. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One.* 2012;7(11):e49452.
33. Nedergaard J, Cannon B. How brown is brown fat? It depends where you look. *Nat Med.* 2013;19(5):540-1.
34. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
35. Duca FA, Lam TK. Gut microbiota, nutrient sensing and energy balance. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16 Suppl 1:68-76.
36. Duenas M, Cueva C, Munoz-Gonzalez I, Jimenez-Giron A, Sanchez-Patan F, Santos-Buelga C, et al. Studies on Modulation of Gut Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches. *Antioxidants (Basel).* 2015;4(1):1-21.
37. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med.* 2016;22(3):250-3.

38. Panagos PG, Vishwanathan R, Penfield-Cyr A, Matthan NR, Shivappa N, Wirth MD, et al. Breastmilk from obese mothers has pro-inflammatory properties and decreased neuroprotective factors. *J Perinatol*. 2016;36(4):284-90.
39. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-8.
40. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559-63.
41. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007;50(11):2374-83.
42. Flock MR, Green MH, Kris-Etherton PM. Effects of adiposity on plasma lipid response to reductions in dietary saturated fatty acids and cholesterol. *Adv Nutr*. 2011;2(3):261-74.
43. Izumi T, Battaglia T, Ruiz V, Perez Perez GI. Gut Microbiome and Antibiotics. *Arch Med Res*. 2017.
44. Vrieze A, Out C, Fuentes S, Jonker L, Reuling I, Kootte RS, et al. Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *J Hepatol*. 2014;60(4):824-31.
45. Stewardson AJ, Gaia N, Francois P, Malhotra-Kumar S, Delemont C, Martinez de Tejada B, et al. Collateral damage from oral ciprofloxacin versus nitrofurantoin in outpatients with urinary tract infections: a culture-free analysis of gut microbiota. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(4):344 e1-11.
46. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(4):227-38.
47. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev*. 2004;9(2):180-97.
48. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-803.
49. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012;489(7415):242-9.

50. Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(9):493-501.
51. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun.* 2013;4:1829.
52. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(43):16767-72.
53. Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ, Jr., Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One.* 2012;7(4):e35240.
54. Inoue D, Tsujimoto G, Kimura I. Regulation of Energy Homeostasis by GPR41. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:81.
55. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15(13):1546-58.
56. Swartz TD, Sakar Y, Duca FA, Covasa M. Preserved adiposity in the Fischer 344 rat devoid of gut microbiota. *FASEB J.* 2013;27(4):1701-10.
57. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):11070-5.
58. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes.* 2010;59(12):3049-57.
59. Hester CM, Jala VR, Langille MG, Umar S, Greiner KA, Haribabu B. Fecal microbes, short chain fatty acids, and colorectal cancer across racial/ethnic groups. *World J Gastroenterol.* 2015;21(9):2759-69.
60. Schele E, Grahnemo L, Anesten F, Hallen A, Backhed F, Jansson JO. The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system. *Endocrinology.* 2013;154(10):3643-51.

61. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*. 2011;60(11):2775-86.
62. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):979-84.
63. Krajmalnik-Brown R, Ilhan ZE, Kang DW, DiBaise JK. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutr Clin Pract*. 2012;27(2):201-14.
64. Parseus A, Sommer N, Sommer F, Caesar R, Molinaro A, Stahlman M, et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut*. 2017;66(3):429-37.
65. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001;104(4):531-43.
66. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):854-9.
67. Jaroslawska J, Chabowska-Kita A, Kaczmarek MM, Kozak LP. Npvf: Hypothalamic Biomarker of Ambient Temperature Independent of Nutritional Status. *PLoS Genet*. 2015;11(6):e1005287.
68. Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*. 1997;387(6628):90-4.
69. Villarroya F, Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab*. 2013;17(5):638-43.
70. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000;404(6778):652-60.
71. Susulic VS, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, Harper ME, et al. Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*. 1995;270(49):29483-92.
72. Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E, Jr., Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, et al. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol*. 1994;266(4 Pt 2):R1371-82.
73. Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*. 1983;305(5936):712-3.

74. Bianco AC, Silva JE. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology*. 1987;120(1):55-62.
75. Montanari T, Poscic N, Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. *Obes Rev*. 2017;18(5):495-513.
76. Amorim BS, Ueta CB, Freitas BC, Nassif RJ, Gouveia CH, Christoffolete MA, et al. A TRbeta-selective agonist confers resistance to diet-induced obesity. *J Endocrinol*. 2009;203(2):291-9.
77. Villicev CM, Freitas FR, Aoki MS, Taffarel C, Scanlan TS, Moriscot AS, et al. Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. *J Endocrinol*. 2007;193(1):21-9.
78. Ribeiro MO, Bianco SD, Kaneshige M, Schultz JJ, Cheng SY, Bianco AC, et al. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2010;151(1):432-40.
79. Lin JZ, Martagon AJ, Cimini SL, Gonzalez DD, Tinkey DW, Biter A, et al. Pharmacological Activation of Thyroid Hormone Receptors Elicits a Functional Conversion of White to Brown Fat. *Cell Rep*. 2015;13(8):1528-37.
80. Kubeck R, Bonet-Ripoll C, Hoffmann C, Walker A, Muller VM, Schuppel VL, et al. Dietary fat and gut microbiota interactions determine diet-induced obesity in mice. *Mol Metab*. 2016;5(12):1162-74.
81. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009;58(7):1509-17.
82. Kocelak P, Zak-Golab A, Zahorska-Markiewicz B, Aptekorz M, Zientara M, Martirosian G, et al. Resting energy expenditure and gut microbiota in obese and normal weight subjects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(20):2816-21.
83. Canfora EE, van der Beek CM, Hermes GDA, Goossens GH, Jocken JWE, Holst JJ, et al. Supplementation of Diet With Galacto-oligosaccharides Increases Bifidobacteria, but Not Insulin Sensitivity, in Obese Prediabetic Individuals. *Gastroenterology*. 2017;153(1):87-97 e3.
84. Chambers ES, Byrne CS, Aspey K, Chen Y, Khan S, Morrison DJ, et al. Acute oral sodium propionate supplementation raises resting energy expenditure and lipid oxidation in fasted humans. *Diabetes Obes Metab*. 2017.

85. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3(4):213-23.
86. Zietak M, Kovatcheva-Datchary P, Markiewicz LH, Stahlman M, Kozak LP, Backhed F. Altered Microbiota Contributes to Reduced Diet-Induced Obesity upon Cold Exposure. *Cell Metab*. 2016;23(6):1216-23.
87. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014;514(7521):181-6.
88. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41.
89. Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab*. 2012;16(3):348-62.
90. Wagner MS, Wajner SM, Dora JM, Maia AL. Regulation of Dio2 gene expression by thyroid hormones in normal and type 1 deiodinase-deficient C3H mice. *J Endocrinol*. 2007;193(3):435-44.
91. CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos. In: Ministério da Ciência e Tel editor. 2013.
92. CFMV. Guia de boas práticas para eutanásia de animais: conceitos e procedimentos recomendados. In: Veterinária CFdM, editor. 2013.
93. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methe BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012;488(7413):621-6.
94. Murphy EF, Cotter PD, Hogan A, O'Sullivan O, Joyce A, Fouhy F, et al. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut*. 2013;62(2):220-6.
95. Norville IH, Hatch GJ, Bewley KR, Atkinson DJ, Hamblin KA, Blanchard JD, et al. Efficacy of liposome-encapsulated ciprofloxacin in a murine model of Q fever. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5510-8.
96. Hwang I, Park YJ, Kim YR, Kim YN, Ka S, Lee HY, et al. Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB J*. 2015;29(6):2397-411.

97. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One*. 2011;6(3):e17996.
98. Silva JE. Full expression of uncoupling protein gene requires the concurrence of norepinephrine and triiodothyronine. *Mol Endocrinol*. 1988;2(8):706-13.
99. Shin W, Okamatsu-Ogura Y, Machida K, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, Kimura K. Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in aged mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(2):417-23.
100. Warner A, Kjellstedt A, Carreras A, Bottcher G, Peng XR, Seale P, et al. Activation of beta3-adrenoceptors increases in vivo free fatty acid uptake and utilization in brown but not white fat depots in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(6):E901-E10.
101. Nagase I, Yoshida T, Kumamoto K, Umekawa T, Sakane N, Nikami H, et al. Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic beta 3-adrenergic agonist. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(12):2898-904.
102. Yoshida T, Sakane N, Wakabayashi Y, Umekawa T, Kondo M. Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL 316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, in yellow KK mice. *Life Sci*. 1994;54(7):491-8.
103. Luvizotto RA, Conde SJ, Sibio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Administration of physiologic levels of triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism*. 2010;59(1):1-6.
104. Alvarez-Crespo M, Csikasz RI, Martinez-Sanchez N, Dieguez C, Cannon B, Nedergaard J, et al. Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol Metab*. 2016;5(4):271-82.
105. Cao Y, Matsubara T, Zhao C, Gao W, Peng L, Shan J, et al. Antisense oligonucleotide and thyroid hormone conjugates for obesity treatment. *Sci Rep*. 2017;7(1):9307.
106. Malik R, Habib M, Tootle R, Hodgson H. Exogenous thyroid hormone induces liver enlargement, whilst maintaining regenerative potential--a study relevant to donor preconditioning. *Am J Transplant*. 2005;5(8):1801-7.
107. Celi FS. Brown adipose tissue--when it pays to be inefficient. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1553-6.

108. Koza RA, Flurkey K, Graunke DM, Braun C, Pan HJ, Reifsnyder PC, et al. Contributions of dysregulated energy metabolism to type 2 diabetes development in NZO/H1Lt mice with polygenic obesity. *Metabolism*. 2004;53(6):799-808.
109. Sell H, Berger JP, Samson P, Castriota G, Lalonde J, Deshaies Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology*. 2004;145(8):3925-34.
110. Moriwaki T, Yasui H, Shigemoto Y, Yoshida NH. A recirculatory model for local absorption and disposition of ciprofloxacin by measuring portal and systemic blood concentration difference. *J Pharm Sci*. 2002;91(1):196-205.
111. Gavaldà-Navarro A, Moreno-Navarrete JM, Quesada-Lopez T, Cairo M, Giralt M, Fernandez-Real JM, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is a negative regulator of adipose tissue browning in mice and humans. *Diabetologia*. 2016;59(10):2208-18.
112. Yao L, Cui X, Chen Q, Yang X, Fang F, Zhang J, et al. Cold-Inducible SIRT6 Regulates Thermogenesis of Brown and Beige Fat. *Cell Rep*. 2017;20(3):641-54.
113. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*. 2012;15(3):395-404.
114. Fischer K, Ruiz HH, Jhun K, Finan B, Oberlin DJ, van der Heide V, et al. Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis. *Nat Med*. 2017;23(5):623-30.
115. de Jong JMA, Wouters RTF, Boulet N, Cannon B, Nedergaard J, Petrovic N. The beta3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017;312(6):E508-E18.
116. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, et al. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(1):97-105.
117. Brix K, Fuhrer D, Biebermann H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. *Thyroid Res*. 2011;4 Suppl 1:S9.
118. Maia AL, Harney JW, Larsen PR. Pituitary cells respond to thyroid hormone by discrete, gene-specific pathways. *Endocrinology*. 1995;136(4):1488-94.

119. Rodriguez M, Carillon C, Coquerel A, Le Fur G, Ferrara P, Caput D, et al. Evidence for the presence of beta 3-adrenergic receptor mRNA in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995;29(2):369-75.
120. Kanzler SA, Januario AC, Paschoalini MA. Involvement of beta3-adrenergic receptors in the control of food intake in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(11):1141-7.
121. Kong WM, Martin NM, Smith KL, Gardiner JV, Connoley IP, Stephens DA, et al. Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology*. 2004;145(11):5252-8.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DA CEUA

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

Brasília, 18 de abril de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"EFEITO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE O RECRUTAMENTO DO ADIPÓCITO BEGE EM CAMUNDONGOS"**, Protocolo n.º 3 /2017, 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: *Mus musculus* (80 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/3/2017 a 1º/12/2019.

Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB

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