

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Rachel Bacha Silva

**EFEITOS DA TRIBUTIRINA SOBRE A PERMEABILIDADE INTESTINAL EM
MODELO MURINO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

Belo Horizonte
2015

Rachel Bacha Silva

**EFEITOS DA TRIBUTIRINA SOBRE A PERMEABILIDADE INTESTINAL EM
MODELO MURINO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite.

Co-orientadora: Dra. Luciana Rodrigues Fernandes Meyer.

Belo Horizonte

2015

043

Silva, Rachel Bacha.

Efeitos da tributirina sobre a permeabilidade intestinal em modelo murino de obesidade induzida por dieta [manuscrito] / Rachel Bacha Silva. – 2015.

57 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Jacqueline Isaura Alvarez Leite. Co-orientadora: Dra. Luciana Rodrigues Fernandes Meyer.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Obesidade. 3. Butiratos. 4. Dieta. 5. Função da barreira intestinal. I. Leite, Jacqueline Isaura Alvarez. II. Meyer, Luciana Rodrigues Fernandes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RACHEL BACHA SILVA.
Aos quatro dias do mês de agosto de 2015 às 10:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeitos da tributirina sobre a permeabilidade intestinal em modelo murino de obesidade induzida por dieta.", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Luciano dos Santos Agum Capettini (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Luana Caroline dos Santos (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Luciana Rodrigues Fernandes Meyer - Co-Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 04 de agosto de 2015.

Dr. Luciano dos Santos Agum Capettini (UFMG)

Dra. Luana Caroline dos Santos (UFMG)

Dra. Luciana Rodrigues Fernandes Meyer - Co-Orientador (UFMG)

Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz
Coordenador de Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me mostrar que basta ter fê e tudo se realizará.

À minha orientadora Prof^a Dra^a Jacqueline Alvarez Leite por acreditar em mim desde o meu primeiro dia no laboratório. Sou muito grata à todos os seus ensinamentos e paciência. Fico feliz pela realização do sonho de trabalhar com uma pessoa que sempre admirei.

À minha co-orientadora Luciana Meyer pelos grandes ensinamentos, orientação, carinho e plena dedicação para que esse trabalho fosse concluído. E hoje, pela amizade.

Ao Prof^o Dr^o Valbert Cardoso pela colaboração e suporte. À Raquel Araújo pela colaboração, em especial, pela grande disponibilidade e dedicação em todas as etapas desse trabalho.

À Prof^a Dra^a Maria do Carmo Pelúzio e Damiana Diniz, pela colaboração e dedicação.

À minha colaboradora e amiga Rachel Freire, por ser meu exemplo de sucesso, pela ajuda plena em todos os momentos, pelos conselhos, enorme dedicação e aprendizados.

À dupla Paola e Penélope, pelo apoio, aprendizado, por serem exemplos de competência e por me darem as mãos desde o início dessa caminhada.

Aos amigos do Labin, à Cris pelas grandes orientações, ao Edenil pelas colaborações e ensinamentos e a Lana pela grande disponibilidade e dedicação ao passar seu conhecimento.

Aos queridos colegas do Labin e ao SAC que, ainda que não tenham acompanhado toda essa jornada, se tornaram uma grande família hoje.

Aos alunos de iniciação científica, Bruna, pela dedicação e disponibilidade, Victor pela ajuda sempre bem atendida.

Aos professores e os colegas dos laboratórios LIB e IMPAR pela ajuda, empréstimos de materiais e contribuições.

À Maria Helena pela grande disponibilidade, atenção e aprendizado, à Eneida e Jamil pela grande disponibilidade. À Poli por toda sua atenção e bom humor diário.

Ao meu pai por sempre me apoiar em todos os aspectos e se dispor à tudo para que eu pudesse concluir não somente esse sonho. Pelo exemplo de garra e amor incondicional.

Ao meu irmão pelos grandes ensinamentos, conversas e por ser o meu mentor de vida. Sempre com muito incentivo em todas essas etapas, exercendo sempre seu papel de maior ídolo e amigo.

À todas as minhas tias-irmãs e tios, à madrinha e ao padrinho, pela torcida, compreensão, grande apoio e união.

Aos primos pela amizade e carinho de sempre.

Às minhas grandes amizades que sempre estiveram presentes, em todas as etapas, de risos e de choro. Em especial aos amigos de Prainamina.

A Joana pela antiga e verdadeira amizade que apoiou e incentivou essa realização. Fê e Bela por fazerem parte de toda essa caminhada, sempre com muito apoio e alegria.

Ao Gustavo Taboada, por sempre me ensinar e ser, exemplo de força e persistência. Pelos grandes aprendizados, apoio, carinho em grandes momentos da minha vida.

À Fernanda Kalil por fazer parte da realização desse sonho e apoio de sempre.

À Nádia Figueiredo e Elizabeth Fonseca, pela competência, disponibilidade e ensinamentos de uma ordem superior.

*PARA SER GRANDE, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A obesidade reúne diversas doenças metabólicas com alterações na homeostase glicêmica que resultam em resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Todas essas alterações estão associadas à uma inflamação de baixo grau que contribui para desenvolvimento e manutenção desse estado. A participação do intestino na inflamação tem sido estudada recentemente como uma inovadora hipótese que propõe uma associação entre a alteração na integridade da barreira intestinal com a obesidade. Vários nutrientes são estudados como possíveis aliados no controle dessas alterações. Os ácidos graxos de cadeia curta e, em especial o butirato, já possuem diversos mecanismos descritos que poderiam auxiliar na melhora da integridade da barreira intestinal. A tributirina, um triglicerídeo com três moléculas de butirato esterificadas a uma de glicerol, tem sido mais utilizada por ser uma pró droga de butirato com mais vantagens farmacocinéticas e menor toxicidade. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os possíveis efeitos da tributirina na permeabilidade intestinal em modelo murino de obesidade induzida por dieta. Para isso foram usados camundongos C57BL machos que foram divididos em dois grupos: obeso (OB), recebendo uma dieta indutora de obesidade e obeso recebendo a mesma dieta acrescida de suplementação de 0,5% de tributirina durante dezesseis semanas experimentais. Os efeitos da suplementação foram avaliados após eutanásia e análise da adiposidade, permeabilidade intestinal e translocação bacteriana. Os resultados mostram que a suplementação de tributirina não teve efeitos na adiposidade e na evolução ponderal. O grupo suplementado, OB TBT teve diminuição da permeabilidade intestinal em relação ao grupo OB. Ainda no grupo OB TBT, foi constatado aumento da expressão da proteína ZO-1 avaliada no íleo e nenhuma mudança na expressão de ocludina e da enzima MLCK. O grupo com a suplementação teve diminuição da translocação bacteriana nos órgãos de via sanguínea e não apresentou diferenças relacionadas a translocação bacteriana no linfonodo. Com esses resultados podemos concluir que a suplementação de tributirina melhora a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana por um mecanismo que envolve o aumento da expressão da proteína da junção firme, ZO-1, que regula a montagem e controle da barreira intestinal.

Palavras-chave: obesidade; tributirina; permeabilidade intestinal.

ABSTRACT

Obesity comprises several metabolic disorders that, are associated with low-grade inflammation that contributes to the development and maintenance of the disease itself. The role of the intestine in the inflammation has been studied and this innovative hypothesis proposes an association between changes in intestinal barrier integrity and obesity. The short chain fatty acid, butyrate possesses various mechanisms that could improve the integrity of intestinal barrier. Tributyrin, a triglyceride with three butyrate molecules, has been used as a butyrate substitute since it less toxic and possesses pharmacokinetic advantages. Here, we evaluate the possible effects of tributyrin in intestinal permeability in a murine model of diet-induced obesity. Male C57BL mice were divided into two groups: Obese (OB), diet-induced obesity and another group receiving the same diet supplemented with 0.5% tributyrin (OB TBT), for 16 experimental weeks. We found that supplementation of tributyrin had no effect on weight gain or adiposity. The supplemented group, OB TBT, showed decreased intestinal permeability relative to the OB group. Moreover, we found na increased expression of ZO-1 protein measured in the ileum in the OB TBT group, there were no changes in the expression of occludin or the MLCK enzyme. The supplemented group presented decreased bacterial translocation in the liver, lung and spleen and no differences in terms of bacterial translocation in the lymph nodes. We can conclude that tributyrin supplementation improves intestinal permeability and bacterial translocation through a mechanism that involves increased expression of the tight junction protein ZO-1, which regulates the control and assembly of the intestinal barrier.

Key-words: obesity; trybutirin; intestinal permeability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia da barreira intestinal: complexos juncionais, junções firmes e aderentes.....	16
Figura 2: Relação entre obesidade e mudanças na permeabilidade intestinal	19
Figura 3: Mecanismos relacionados à translocação bacteriana.....	21
Figura 4: Consumo calórico, evolução ponderal, tecido adiposo epididimal (TAE) e adiposidade.....	37
Figura 5: Altura das vilosidades do íleo	38
Figura 6: Concentração residual de butirato avaliada em estômago, ceco e fígado	39
Figura 7: Avaliação da permeabilidade intestinal por ^{99m}Tc -DTPA 2h e 4h após gavagem	40
Figura 8: Avaliação da expressão das proteínas da junção firme (occludina e ZO-1) e da enzima MLCK no íleo por PCR em tempo real.....	41
Figura 9: Avaliação de translocação bacteriana por ^{99m}Tc - <i>E. coli</i> em linfonodo, fígado, sangue, pulmão e baço.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas DIO e DIO suplementada com 0,5%de tributirina	30
Tabela 2: Distribuição energética (% do valor calórico total) e densidade calórica das dietas DIO e DIO + TBT	30
Tabela 3: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para o PCR em tempo real no íleo.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{99m}Tc	Tecnécio
ABR	Região ligante de actina
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
BHT	Hidroxitolueno butilato
CEBIO	Centro de bioterismo
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CPM	Contagem por minuto
DHA	Ácido docosahexaenóico
DIO	Dieta indutora de obesidade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTPA	Ácido dietilenoaminopentacético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EPA	Ácido ecosapentaenóico
FFA	Receptor de ácido graxo livre
G	Grama
GLP	Peptídeo semelhante ao glucagon
GPR	Receptor acoplado à proteína G
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
JAM	Molécula de adesão juncional
KCAL	Quilocalorias
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCT	Transportador de monocarboxilatos
ml	Mililitro
MLC	Cadeia leve de miosina

MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
Mm	Milimolar
Mmol	Milimolar
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
OB TBT	Obeso com suplementação de tributirina
OB	Obeso
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEX	Proteína de membrana proxissomal
PKC	Proteína quinase C
PPAR	Receptor ativado de proliferação de peroxissomo
RNA	Ácido ribonucleico mensageiro
TAE	Tecido adiposo epididimal
TBT	Tributirina
TNF	Fator de necrose tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ZO-1	Zônula ocludente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Barreira intestinal.....	16
2.2 Obesidade e permeabilidade intestinal	18
2.3 Translocação bacteriana relacionada à barreira intestinal	20
2.4 Nutrientes que influenciam na obesidade.....	22
2.5 Butirato e Tributirina.....	23
2.5.1 <i>Butirato.....</i>	23
2.5.1.1 <i>Butirato na inflamação</i>	25
2.5.1.2 <i>Butirato na redução da permeabilidade e translocação bacteriana</i>	26
2.5.2 <i>Tributirina e vantagens em relação ao uso de butirato</i>	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Animais	29
4.2 Delineamento Experimental.....	29
4.3 Dieta indutora de obesidade e suplementação de tributirina	29
4.4 Retirada do tecido adiposo epididimal e cálculo de adiposidade	31
4.5 Análise de altura das vilosidade	31
4.6 Quantificação de Butirato - por HPLC.....	31
4.7 Avaliação da permeabilidade intestinal por DTPA (^{99m}Tc).....	32
4.8 Análise da amplificação de mRNA de proteínas da junção firme.....	33
4.8.1 <i>Extração do RNA.....</i>	33
4.8.2 <i>Síntese do cDNA.....</i>	33
4.8.3 <i>Amplificação do cDNA por PCR em tempo real.....</i>	34

4.9 Translocação Bacteriana	35
4.9.1 <i>Procedimento de marcação da E. coli</i>	35
4.9.2 <i>Determinação da translocação bacteriana</i>	36
4.10 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Consumo calórico, evolução ponderal e adiposidade	37
5.2 Avaliação da altura de vilosidades	38
5.3 Quantificação de butirato residual.....	38
5.4 Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana	39
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO.....	55
ANEXO A: Certificado de aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais	56

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença que tem prevalência crescente nos últimos anos e representa um dos principais desafios da saúde pública na atualidade. Fatores genéticos associados a fatores ambientais como alimentação, atividade física e o controle do gasto energético podem acarretar em um balanço favorável ao excesso de peso (1).

Esforços têm sido feitos na tentativa de estabelecer possíveis aliados ao controle e tratamento da obesidade. Estudos recentes estabeleceram uma relação entre o ambiente intestinal e obesidade, onde alterações na permeabilidade intestinal associada a mudanças no padrão das junções firmes e outras alterações metabólicas decorrente desse processo, contribuem para a inflamação e desordens metabólicas presentes na obesidade (2-4).

O padrão alimentar, especialmente dietas ricas em gorduras, parece influenciar negativamente o controle da permeabilidade intestinal e, portanto, tem sido alvo frequente de estudos. (5, 6). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), possuem inúmeros mecanismos já descritos na literatura, como efeitos anti-inflamatório e antioxidantes em doenças que acometem o epitélio intestinal. (7). O butirato, em especial, tem sido descrito como possível aliado ao controle de alterações na barreira intestinal por ter ação direta no controle da expressão de algumas proteínas da junção firme e mudanças no perfil inflamatório associado a obesidade e doenças metabólicas (8, 9).

Além do butirato, estudos recentes, mostram vantagens do uso da tributirina (triglicerídeo contendo 3 butiratos) em relação ao butirato de sódio com vantagens farmacocinéticas, disponibilidade e outros fatores como toxicidade e odor. A tributirina tem sido descrita como o nutriente benéfico no controle da inflamação de baixo grau presente obesidade e em outras alterações associadas a ela (10, 11) .

Ainda não são descritos estudos que associem o uso da tributirina à redução de permeabilidade intestinal relacionada à obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Portanto, torna-se promissor avaliar a possível suplementação desse em modelo de obesidade e, portanto, justifica-se o desenvolvimento do presente estudo.

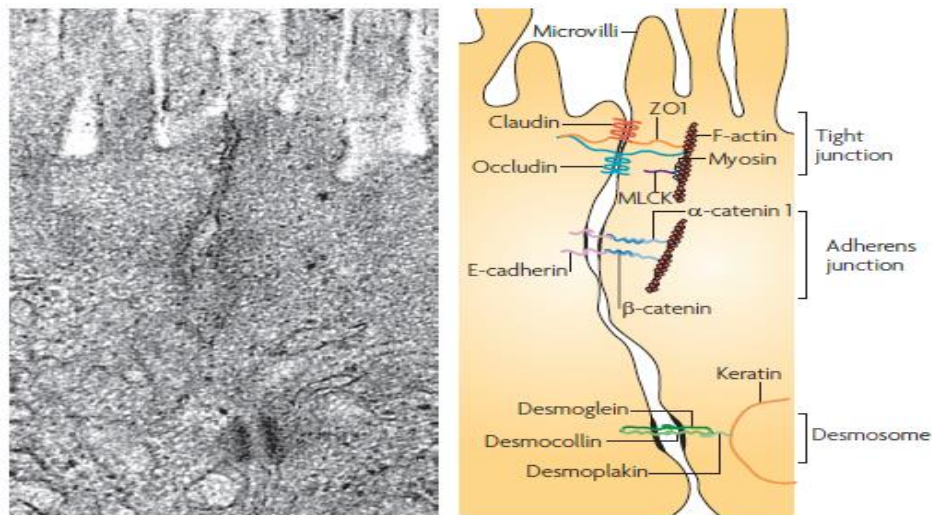
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Barreira intestinal

A barreira intestinal é composta de células epiteliais que permitem uma permeabilidade seletiva. O epitélio intestinal no estado íntegro é um limite entre o lúmen e a lâmina própria, que permite absorção adequada de nutrientes, água, solutos e previne de forma efetiva a passagem de moléculas nocivas tais como patógenos, toxinas e antígenos (12, 13).

A permeabilidade intestinal é regulada pelos complexos junctionais e os seus principais constituintes são as junções firmes e as junções aderentes como mostra Figura 1. (12). Este transporte de moléculas para lúmen intestinal por meio da membrana é denominado transporte transepitelial que engloba tanto o transporte transcelular, que ocorre através das células, quanto o paracelular que ocorre entre elas (14).

Figura 1: Anatomia da barreira intestinal: complexos junctionais, junções firmes e aderentes



Notas: Micrografia eletrônica e representação esquemática do complexo junctional das células epiteliais do intestino. Abaixo das microvilosidades, as membranas plasmáticas de células adjacentes fundem-se na junção firme, onde as proteínas claudinas, zônulas ocludante 1 (ZO1) e ocludinas interagem com a F-actina. E-caderina, α -catenina 1, β -catenina, δ 1 catenina interagem com F-actina para formar a junção aderente. A quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) é associada com o anel de actomiosina perijunctional e tem como função a regulação da barreira intestinal.

Fonte: adaptado de Turner *et al.* (2009).

As junções firmes são complexos proteicos localizados na extremidade apical da membrana lateral das células epiteliais. Algumas proteínas transmembrana como: ocludina,

claudina, molécula de adesão juncional (JAM) fazem parte de enorme grupo que constitui mais de 24 membros. Os domínios intracelulares dessas proteínas interagem com zônulas ocludentes (ZO-1), uma proteína citosólica, que a partir dessa interação fixa outras proteínas transmembrana à um anel perinjuncional de actina e miosina que é essencial para regulação da barreira intestinal (4, 15).

Alterações na barreira são provocadas por reorganização das proteínas das junções firmes e contração do anel perijuncional ligado às células epiteliais. As mudanças na contração do anel são provocadas por ação da quinase da cadeia leve de miosina - myosin light chain kinase – (MLCK) que fosforila a cadeia leve de miosina (MLC) e provoca contração do anel e assim, a abertura de via paracelular. (4, 16).

A função e localização das proteínas da junção firme são descritos na literatura para compreensão das alterações na barreira intestinal. Mas algumas informações acerca da função de cada uma delas ainda não está bem esclarecida. A ocludina é sustentada pela família das proteínas zônulas ocludentes (ZO) para a ligação ao citoesqueleto de actina. A alteração ou ausência na atividade dessa proteína resulta em diminuição da integridade da barreira intestinal. Proteínas ZO possuem multi domínios e participam, de forma relevante, na regulação da estrutura das junções firmes e consequentemente da barreira. A família dessas proteínas ZO que constituem ZO-I, ZO-2, ZO-3 localizam-se no contato nascente entre células, mostrado por estudos de cultura celular e em modelos animais, o que a torna importante para montagem inicial das junções firmes. (15, 17).

Diversos fatores podem acarretar mudança na integridade da barreira intestinal. Algumas citocinas pró inflamatórias têm influência na integridade da barreira, no entanto um mecanismo que justifique de que forma cada uma delas atua reduzindo a integridade da barreira ainda não está bem esclarecido. Ma Ty *et al*, (18) verificaram a ação de TNF α na redução da permeabilidade intestinal por alteração das junções firmes em células Caco2. Esse estudo esclareceu de forma inédita uma possível ação dessa citocina, comprovando que houve uma regulação negativa de ZO-1 mediada por NF-kB que resultou em alteração das junções firmes. Muitos estudos relacionando o papel de citocinas na regulação da barreira ainda apontam que mecanismos não estão claros e citam uma possível influência de IL-4, IL-10 e INF- γ em diversas condições (12, 19, 20).

Além de doenças inflamatórias intestinais e outras condições que acometem de forma significativa e direta o epitélio, estudos recentes demonstram que a obesidade também está relacionada a essa condição (21-24).

2.2 Obesidade e permeabilidade intestinal

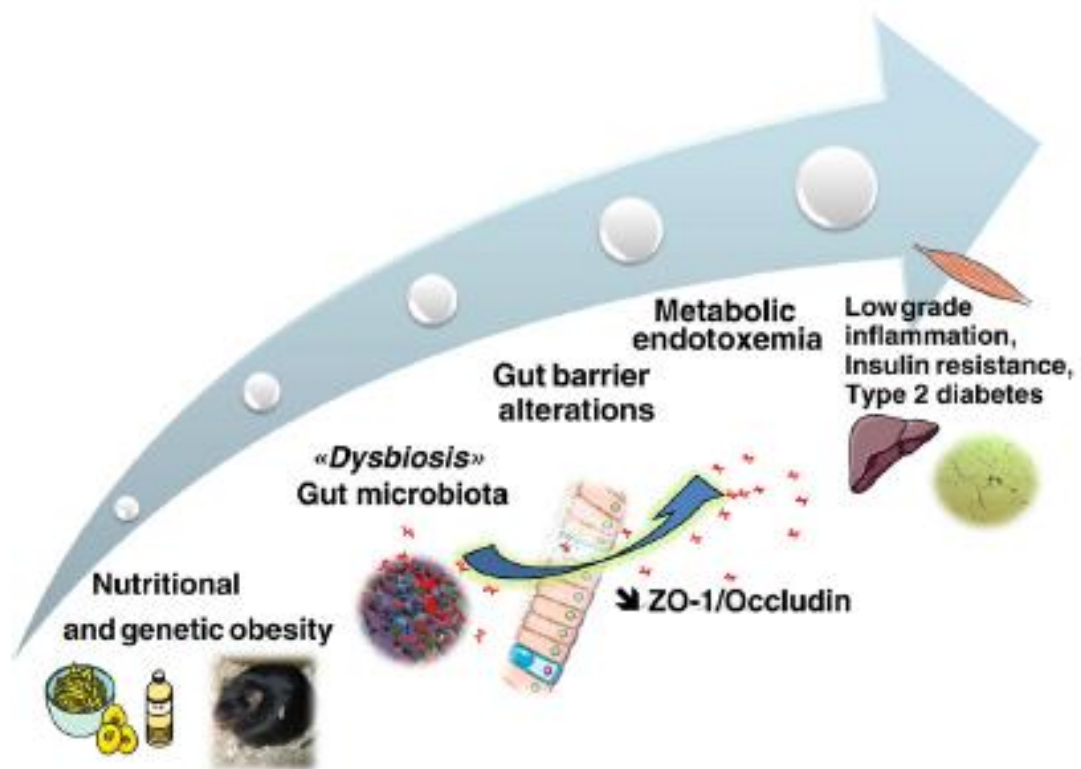
O aumento permeabilidade e redistribuição de proteínas da junção firme foram demonstrados em modelos animais de obesidade (21-23).

Cani *et al.* (25) descreveram que em camundongos geneticamente obesos ob/ob e naqueles que receberam dieta rica em gordura, as mudanças na microbiota intestinal estão associadas a endotoxemia metabólica, a desordens metabólicas e a inflamação por mecanismos relacionados ao aumento de permeabilidade intestinal. Em seguida, Cani *et al.* (2) verificaram nos mesmos grupos de animais do estudo anterior, que o uso de um espectro de antibióticos foi capaz de promover melhora da inflamação, da intolerância a glicose e do ganho de peso e recuperar a integridade da barreira intestinal por mudanças na expressão de proteínas como ocludina, ZO-1 e na permeabilidade intestinal.

O funcionamento correto da barreira intestinal é essencial para evitar a translocação de moléculas inflamatórias como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Evidências sugerem uma hipótese inovadora, onde a alteração da integridade da microbiota intestinal pode ser responsável pela endotoxemia metabólica, causada pelo aumento das concentrações do LPS no plasma que pode ocorrer em resposta à dieta rica em gordura. Infusões contínuas de endotoxina ou aumento em seu nível basal induzido por dieta rica em gordura pode levar ao aumento de resistência à insulina e obesidade (2, 25, 26).

Foi também foi demonstrado que alterações no padrão de distribuição das proteínas da junção firme (occludina e ZO-1) no epitélio da região ileal em dietas ricas em gorduras e maior liberação de toxinas bacterianas na circulação portal em camundongos obesos (21). A Figura 2 apresenta a associação da dieta rica em gordura, permeabilidade intestinal e doenças metabólicas.

Figura 2: Relação entre obesidade e mudanças na permeabilidade intestinal



Notas: A microbiota intestinal está envolvida nas doenças metabólicas associadas a obesidade. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica e fatores genéticos *ob/ob* estão associados com a disbiose intestinal. A mudança no perfil da microbiota intestinal leva a alteração na permeabilidade intestinal onde ocorre redistribuição das proteínas da junção firme (occludina e ZO-1). Isso resulta em aumento do LPS no sangue, sendo que essa endotoxemia metabólica contribui para exacerbar a inflamação crônica de baixo grau e a resistência à insulina presentes na obesidade.

Fonte: Cani e Delzenne (2011).

Brun *et al.* (21) verificaram uma nova evidência para patogênese da esteatohepatite não alcoólica através da confirmação da relação entre aumento de permeabilidade intestinal e obesidade. Neste estudo, Brun e seus colaboradores observaram o aumento da permeabilidade intestinal em camundongos geneticamente obesos *ob/ob* através do uso de medida da resistência transeptitelia com a técnica de Ussing Chamber e da alteração das proteínas da junção firme no íleo. Susuki e Hara (22) também comprovaram que o aumento da permeabilidade intestinal está associada com a inflamação de baixo grau, característica na obesidade, por meio da análise da mudança na integridade da barreira intestinal e alteração na expressão de proteínas da junção firme relacionadas a manutenção desse controle.

Lam *et al.* (27) estudando camundongos recebendo dieta indutora de obesidade, encontraram aumento de permeabilidade intestinal com diminuição na expressão de ZO-1, além da diminuição na resistência transeptitelia, que confirma aumento da permeabilidade. Outros estudos como de Kim *et al.* (6) também verificaram que em dieta rica em gordura

houve mudança na permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, aumento de endotoxemia no lúmen, no plasma e inflamação em camundongos.

Alguns fatores justificam o aumento da permeabilidade intestinal vista na obesidade induzida por dieta rica em gordura ou fator genético. Resultados do trabalho de Lam *et al* (27) mostram que a dieta rica em gordura provoca mudanças metabólicas que prejudicam a função da barreira intestinal como a alteração da resistência transepitelial medida no intestino que se traduz em aumento da permeabilidade intestinal e diminuição da expressão de mRNA de ZO-1 que é uma das proteínas da junção firme responsável por manutenção da integridade da barreira.

Algumas citocinas pró inflamatórias como TNF- γ estão associadas com aumento da expressão e atividade de MLCK que por consequência leva a desordem da barreira e aumento da permeabilidade intestinal(18). Portanto, é possível relacionar a expressão aumentada de citocinas pró inflamatórias na obesidade com aumento da permeabilidade intestinal principalmente via endotoxemia metabólica e alteração das junções firmes (28).

2.3 Translocação bacteriana relacionada à barreira intestinal

A translocação bacteriana é definida por passagem de bactérias viáveis e não viáveis ou endotoxinas do lúmen intestinal para linfonodos mesentéricos e posteriormente para circulação (13, 29).

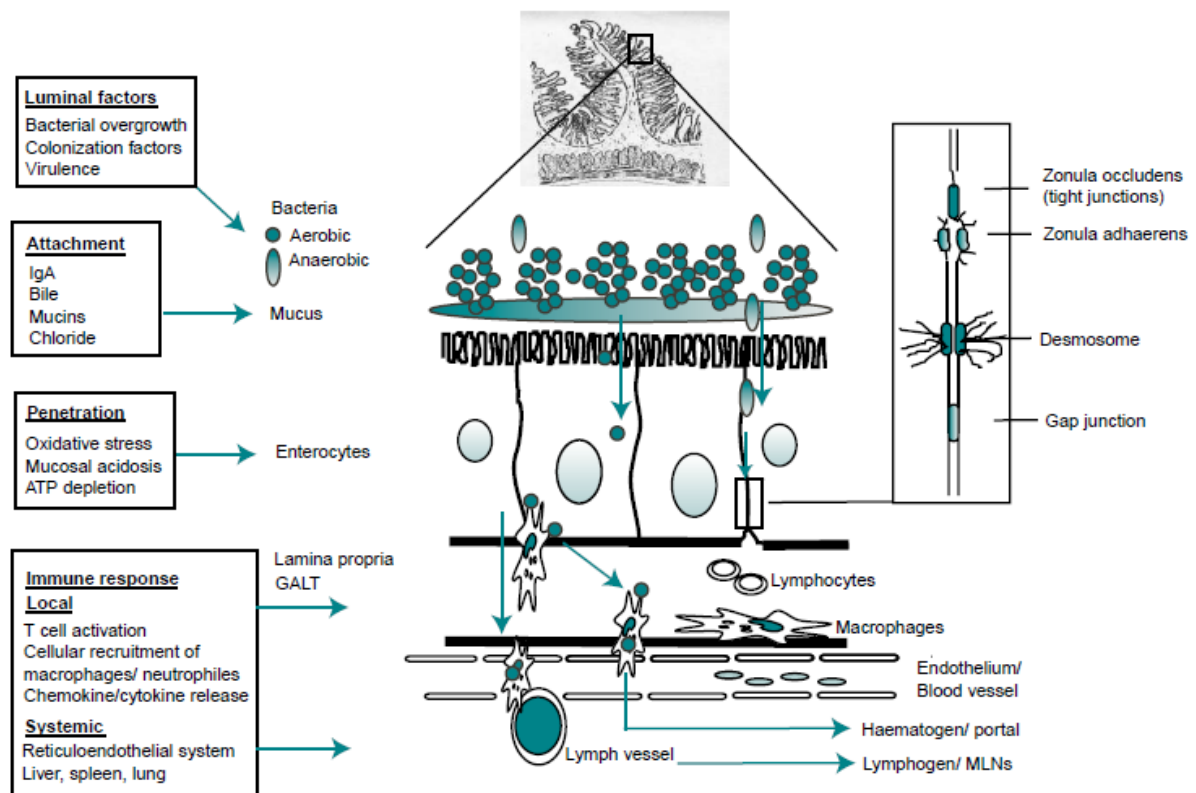
A translocação bacteriana pode ser mediada de três formas que foram descritas por Deitch *et al.*, (30) sendo que uma delas se define pela ocorrência da alteração na integridade da barreira intestinal promovendo translocação de bactérias e compostos tóxicos que são drenados pelos linfonodos mesentéricos e causam reação inflamatória.

Evidências recentes demonstraram que a translocação bacteriana pode resultar em inflamação sistêmica não somente pela passagem das bactérias, mas também por injúrias provocadas por componentes inflamatórios produzidos na parede intestinal e toxinas produzidas no intestino. Essa hipótese ampliou a definição de translocação relacionada com permeabilidade intestinal que resulta em inflamação sistêmica e acomete órgãos distantes (20).

A translocação que ocorre pelas junções firmes é decorrente da osmolalidade luminal e dano do citoesqueleto do enterócito e das proteínas da junção firme que estão sustentadas por filamentos de actina. Dessa forma, grandes moléculas ou toxinas podem alcançar a camada mucosa subepitelial e posteriormente a corrente sanguínea devido a essa abertura das junções

firmes.(20). Os mecanismos que envolvem a translocação incluem tanto uma alteração no crescimento bacteriano normal que é resultante de alteração na microbiota quanto o rompimento físico da barreira intestinal com alteração da resposta imunológica que é decorrente dos danos causados aos enterócitos (13) (Figura 3).

Figura 3: Mecanismos relacionados à translocação bacteriana



Notas: Parâmetros que aumentam a translocação bacteriana englobam mudanças anatômicas e funcionais: um dos mecanismos envolvidos na translocação bacteriana envolvem o dano à barreira epitelial.

Fonte: Wiest e Rath (2003).

A função da barreira intestinal íntegra depende de uma microbiota intestinal normal, muco epitelial, secreção de IgA e células imunológicas para que o mecanismo de defesa seja eficiente.(20) Quando ocorre uma perda na função da barreira por alteração da microbiota e permeabilidade, torna-se possível a translocação de endotoxinas que leva a produção de citocinas e moléculas pró inflamatórias contribuindo para o quadro de doenças metabólicas como obesidade(31).

Um estudo desenvolvido por Ammar *et al.* (32) demonstrou como a translocação bacteriana de bactérias comensais pode influenciar hiperglicemia e uma inflamação de baixo grau presente na diabetes tipo 2 por uso de dieta rica em gordura. O padrão da dieta pode

influenciar na alteração da microbiota que está relacionado a inflamação, alteração na barreira intestinal, resistência à insulina (5, 33).

Citocinas como TNF α e IFN γ , que são frequentemente associadas a doenças metabólicas, também influenciam o controle da barreira intestinal por promoverem mudanças na contração do anel de actina e miosina, com isso, abertura das junções com perda da integridade da barreira (34).

2.4 Nutrientes que influenciam na obesidade

Estudos que buscam nutrientes aliados a provável redução da inflamação ou melhora de desordens metabólicas tem sido cada vez mais frequentes. Alguns nutrientes podem ser capazes de alterar a microbiota de forma favorável e agir como um possível aliado no controle da obesidade. Mc Allan *et al.*, (35) observaram em camundongos com obesidade que em uma dieta rica em gordura, a alteração do tipo de proteína é capaz de alterar filos bacterianos, a relação de massa gorda e massa magra e gasto energético.

A microbiota exerce forte influência no controle da homeostase da glicemia e no gasto energético (2, 36). Portanto, o tipo de dieta e a modulação da microbiota têm sido alvos de estudos que buscam aliados ao controle da obesidade.

Dietas ricas em gorduras tem sido cada vez mais investigadas como um forte componente para alteração da microbiota, permeabilidade intestinal e desenvolvimento de doenças metabólicas. Cani *et al.* (25) descreveram o papel da dieta rica em gordura em promover endotoxemia metabólica e influenciar na obesidade e resistência à insulina. A partir desse estudo outros comprovaram novamente a influência da dieta rica em gordura na alteração da microbiota, permeabilidade intestinal e a associação com doenças metabólicas incluindo a obesidade.

Três filos têm sido relacionados às mudanças metabólicas relacionadas à obesidade. Sendo eles: as bactérias gram positivas dos filos - ***Firmicutes*** e ***Actinobacteria*** e as gram negativas do filo- ***Bacteroidetes***. Os obesos apresentam uma redução da abundância relativa de aproximadamente 50% de ***Bacteroidetes*** e aumento proporcional de ***Firmicutes***. E essa alteração está diretamente relacionada a maior absorção de energia advinda da dieta que é comprovada por meio de experimentos com transplante de microbiota. (37, 38).

Paralelamente aos estudos que definem fatores que contribuem para alteração da microbiota e permeabilidade intestinal, outros trabalhos buscam entender quais nutrientes poderiam exercer papel protetor ou modulador nessas alterações.

Mujico *et al.* (39) verificaram o efeito da suplementação de ácidos graxos (EPA e DHA, 3000 mg/kg) na modulação da microbiota intestinal e ganho de peso em camundongos com ou sem dieta rica em gordura. A suplementação utilizada promoveu mudanças em filos bacterianos que resultou em melhora do ganho de peso. Na obesidade, há maior abundância relativa de *Bacteroidetes* que está associada ao ganho de peso e, portanto, as mudanças encontradas foram favoráveis a este controle, uma vez que houve restauração da colonização por *Firmicutes* e *Bifidobacterium*.

Lin *et al.* (8) observaram que ácidos graxos de cadeia curta: propionato, acetato e butirato foram capazes de proteger camundongos contra dieta indutora de obesidade e do aparecimento de obesidade resistência à insulina através da indução de hormônios intestinais e redução de ingestão alimentar. Dessa forma, é possível observar como alguns nutrientes como os ácidos graxos de cadeia curta tem potencial de influenciar de forma benéfica em parâmetros relacionados ao desenvolvimento e manutenção da obesidade.

A dieta também pode influenciar na produção de ácidos graxos de cadeia curta e influenciar de forma positiva o controle da obesidade como mostrado por Remely *et al.*(40) que promoveram uma intervenção dietética baseada em “guidelines” para prevenção e terapia da obesidade e constaram alteração favorável no peso e nos filos bacterianos, com maior abundância relativa de espécies como *Faecalibacterium prausnitzii* , produtoras de butirato.

2.5 Butirato e Tributirina

2.5.1 Butirato

O butirato é um ácido graxo de cadeia curta produzido por fermentação bacteriana intestinal. A disponibilidade do butirato está associada à sua produção colônica. A principal fonte advém da fermentação colônica de fibras dietéticas, principalmente as fibras solúveis, que estão associadas a maior aumento dessa produção. O butirato também pode ser encontrado em alimentos como queijo e manteiga (41).

A habilidade em produzir butirato é atribuída a uma diversidade de bactérias gram positivas no cólon e alterações na dieta podem modificar a abundância relativa de espécies

produtoras. Além de que nutrientes ingeridos, como carboidratos fermentáveis, e a quantidade desse macronutriente dentro da dieta, influenciam na produção do ácido graxo(42).

A absorção do butirato pode ocorrer por diferentes formas ao longo da membrana apical dos colonócitos e dependerá da forma em que se encontra (ionizada ou protonada), determinada pelo pH (43). Na forma dissociada e protonada, butirato se torna lipossolúvel e sua absorção ocorre por difusão, através das trocas de AGCC com HCO. Na forma ionizada ocorre transporte ativo por transportadores de ácidos graxos de cadeia curta como o transportador de monocarboxilatos (MCT1) que transporta o butirato através da membrana luminal do colonócito. (41).

Os transportadores monocarboxilatos representam um tipo de transportador de ácidos graxos de cadeia curta. O MCT-1 é uma isoforma associada a este transporte, no entanto Gill *et al* (44) verificaram que outras isoformas, 4 e 5 também poderiam estar envolvidas nesse transporte. A isoforma 1 tem sua localização ao longo do comprimento do intestino e na membrana apical, enquanto que a 4 e a 5 são mais presentes no cólon e se localizam na região basolateral dos colonócitos. No entanto, em estudo mais recente, Halestrup *et al.* (45) caracterizou a família de transportadores monocarboxilatos e atribuiu à eles diversas funções como: carreadores de piruvato, lactato e corpos cetônicos e manteve a definição de que MCT-1 é a isoforma que possui maior afinidade para transporte de ácidos graxos de cadeia curta, incluindo butirato.

Dentro do colonócito, a abundância de butirato, por sua vez, é capaz de aumentar a concentração do mRNA do MCT-1 tanto pelo aumento da transcrição gênica como pela maior estabilidade do MCT-1 transcrito (46). Confirmando essa hipótese, Tudela *et al.* 2015 investigaram em porcos, com experimentos *in vivo* e *in vitro*, que a expressão colônica de MCT-1 é maior ao incubarem células Caco2 com butirato de sódio. Nesse trabalho concluíram que há uma regulação positiva na expressão do receptor MCT-1 pelo butirato. Nesse aspecto, é possível inferir que esse mecanismo pode servir para aumentar a disponibilidade de butirato intracelular, portanto, fonte de energia e manutenção da homeostase no cólon.

Após sua absorção, o butirato exerce seu papel na interação com células do organismo através da ligação com receptores acoplados a proteína G (GPR) ou receptores de ácidos graxos (FFAR- free fatty acid receptor), especificamente o GPR41 (FFA1) e 43 (FFA3) que estão na membrana plasmática celular. (47, 48)

Segundo estudo recente, desenvolvido por Kim *et al* (49), a ativação dos receptores GPR41 (FFA1) e 43 (FFA3 pelos ácidos graxos de cadeia curta está associada à respostas

imunes mediada em células epiteliais do intestino, como liberação de citocinas e produção de quimiocinas, o que sugere efeito protetor desse processo. Em outro aspecto, estudos relacionando o butirato à GPR41 e 43, como o de Vinolo *et al* (9), também demonstraram um papel importante no qual a ligação de butirato a esses receptores foi capaz de melhorar o metabolismo da glicose por estimular secreção de GLP-1 (glucagon like peptide -1).

2.5.1.1 Butirato na inflamação

Butirato tem efeito anticarcinogênico, anti-inflamatório, anti-oxidante e sacietogênico e aumenta o controle da integridade da barreira intestinal(41). Essas ações do butirato podem ser devidas a três mecanismos principais: seu efeito como inibidor da enzima histona desacetilase, sua ação via receptores acoplados a proteína G como GPR41 e 43 e FFAR (receptor de ácido graxo livre) e também pode agir se ligando a elementos responsivos a um gene alvo. (48).

O butirato é reconhecido pelo mecanismo de ação relacionado à inibição de histona desacetilase (HDAC). Butirato inibirá a ação de HDAC, de forma que a atividade de histona acetiltransferase (HAT) resulta em hiperacetilação das histonas, que remodela a estrutura da cromatina e regula a expressão gênica. Em estudos relacionando a sua ação no tratamento e prevenção de câncer, o butirato atua aumentando expressão de genes envolvidos com inibição da proliferação celular e induz apoptose em células cancerosas. Esses efeitos estão ligados a sua absorção no colonócito seguido de diferenciação e proliferação celular via inibição de histona desacetilase (50, 51).

O efeito anti-inflamatório do butirato envolve diversas funções como a regulação da produção de citocinas por leucócitos (IL-2, IL-6, TNF α e IL-10) e o recrutamento para o sítio de inflamação. Além disso, inibe o estímulo induzido por expressão de moléculas de adesão, produção de quimiocinas e suprime recrutamento de monócitos/macrófagos o que controla a inflamação. E ainda, papel desse ácido graxo como inibidor de HDAC também está associado ao controle de inflamação por inibir o fator de transcrição NF-kB (10, 41, 52, 53).

O butirato também reduz danos na mucosa intestinal associado a inflamação mediada por citocinas pró inflamatórias e células do sistema imunológico (54). Leonel *et al*,(7) verificaram o efeito anti-inflamatório exercido por butirato, através da administração de tributirina, um triglicerídeo contendo butirato, em modelo de colite induzida em camundongos. Os resultados desse estudo mostraram a capacidade do butirato em reduzir o

dano à mucosa com a diminuição do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos, aumento de células T reguladoras e citocina IL-10 na lâmina própria.

2.5.1.2 Butirato na redução da permeabilidade e translocação bacteriana

Butirato desempenha um importante papel no controle da permeabilidade intestinal. Diversos estudos relacionam vias de atuação do ácido graxo na integridade da barreira. Huang *et al.*, (55) avaliaram em células intestinais Caco2 a diminuição da permeabilidade intestinal com uso de butirato e sugerem nesse estudo que esse controle está relacionado à ativação da via de p38 mitogen activated protein kinase (MAPK).

O mecanismo de atuação de butirato como inibidor de HDAC descrito anteriormente, pode promover regulação na expressão das proteínas de junção firme, como as proteínas da zônula de oclusão: ZO-1 e ZO-2 em cultura celular, regulando positivamente essa expressão (56).

Em outro estudo, butirato também foi capaz de aumentar a expressão de outra proteína da junção firme, claudina 1, por promover maior associação do seu fator de transcrição, SP1 com seu gene promotor, em células intestinais (57) .

Kinoshita *et al.* (58) observaram que a capacidade do butirato em reduzir a permeabilidade celular vista em doenças inflamatórias intestinais ocorre através do aumento de ativação de PPAR γ o que se torna favorável para prevenção de inflamação uma vez que esse fator de transcrição é altamente expresso em células epiteliais colônicas e sua modulação se torna eficiente no controle de doenças inflamatórias intestinais. (59).

A manutenção da integridade da barreira intestinal com suplementação de butirato também está associada ao controle da expressão de proteínas da junção firme que regulam a barreira intestinal e à ação do butirato em promover este controle. Wang *et al.*, (57) verificaram que butirato de sódio foi capaz de diminuir a permeabilidade intestinal através do aumento da expressão de claudina-1 que influenciou na redistribuição de ocludina e ZO-1 normalizando a função da barreira. Atribuíram esse mecanismo pelo efeito de butirato em favorecer a transcrição gênica de claudina-1.

2.5.2 Tributirina e vantagens em relação ao uso de butirato

O butirato tem diversas aplicações e formas de administração, no entanto, quando administrado por via oral, dois fatores se tornam importantes: sua aceitação, devido à baixa palatabilidade, forte odor característico e sua baixa disponibilidade no intestino grosso.(48)

Dessa forma, alguns estudos comprovam as vantagens da administração da tributirina, uma pró droga do butirato, que é um triglicerídeo que contém três porções de butirato esterificados a um glicerol e se encontra na forma líquida. Quando metabolizada há liberação do butirato por ação de lipases o que a torna mais favorável em manter quantidades maiores de butirato após administração. De forma específica, tem-se que um grama de tributirina produz 10 mmoles de butirato (11) .

Egorin *et al.* (60) identificaram os principais aspectos relevantes em relação às vantagens farmacocinéticas e toxicidade quando compararam as doses de butirato e tributirina administradas em ratos. Chei e Bretman (61) também afirmam que a meia vida curta de butirato de sódio teve seus efeitos solucionados ao se utilizar a tributirina, essa forneceu aumento de quatro vezes na diferenciação celular em relação ao butirato e portanto efeitos melhores para o tratamento proposto neste estudo. Gashot *et al.* (62) também comprovaram efeitos superiores da administração de tributirina para diferenciação celular em células Caco2 que podem ser grande aliado ao tratamento de câncer colorretal.

Trabalhos recentes também avaliam a tributirina como um aliado a diminuição da permeabilidade intestinal via regulação das proteínas da junção firme. Cresci *et al.* (62) investigaram a suplementação de tributirina como um tratamento profilático para os danos intestinais provocados pelo uso de álcool e verificaram que seu papel protetor está associado a reestabelecimento da barreira por aumento da expressão de ZO-1, ocludina e no receptor de butirato, GPR109A, no íleo de camundongos.

No entanto, ainda são poucos os estudos que relacionam a tributirina com controle na obesidade ou alterações associadas. Vinolo *et al.* (9) verificaram esse aspecto, a administração de tributirina em camundongos e observou melhora em parâmetros inflamatórios e desordens metabólicas como resistência à insulina que estão associadas a obesidade induzida por dieta.

Um outro estudo desenvolvido por Weng *et al.* (10) também verificaram o provável mecanismo da tributirina na melhora do metabolismo lipídico e portanto aliado a controle de obesidade. Observaram o papel da tributirina em induzir PPAR γ e um fator para biogênese de peroxissomos, Pex11a, que por estarem relacionados com a β - oxidação podem promover melhora do metabolismo lipídico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar efeitos da tributirina (TBT) sobre a permeabilidade intestinal em modelo murino de obesidade induzida por dieta.

3.2 Objetivos específicos

Observar no modelo murino de obesidade induzida por dieta se:

1. A ingestão de TBT altera o ganho de peso e adiposidade corporais;
2. É possível detectar mudanças na concentração de TBT e de seu receptor intestinal nos períodos de jejum prolongado;
3. A TBT tem efeitos tróficos do intestino delgado;
4. Ocorrem mudanças na permeabilidade intestinal consequente ao uso de TBT, avaliadas por meio das técnicas de administração oral de DTPA marcado com tecnécio, expressão das proteínas da junção firme e enzima MLCK;
5. A translocação bacteriana, avaliada com a presença de *E. coli* marcada com tecnécio em tecidos periféricos, é alterada pela ingestão de TBT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 entre quatro à seis semanas de idade obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas - CEBIO e mantidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram expostos a ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo de pesquisa nº. 230 / 2013.

4.2 Delineamento Experimental

Os camundongos foram mantidos em gaiolas com até três animais durante todo experimento. Os animais foram divididos entre 2 grupos:

1. **Grupo obeso:** 26 animais receberam dieta indutora de obesidade DIO e água ad libitum.
2. **Grupo obeso + tributirina:** 26 animais receberam dieta indutora de obesidade com adição de 0,5% de tributirina DIO TBT e água ad libitum.

4.3 Dieta indutora de obesidade e suplementação de tributirina

Os animais receberam a dieta indutora de obesidade durante 16 semanas experimentais. Para indução da obesidade, os animais receberam dieta hiperlipídica, com 60% a energia em forma de gordura saturada durante o período citado (63), sendo grupo obeso e grupo obeso + tributirina com a suplementação já adicionada no preparo da dieta na concentração de 0,5%. A composição e relação de percentual de nutrientes das dietas administradas estão a seguir representadas nas Tabelas 1 e 2 abaixo.

Tabela 1: Composição das dietas DIO e DIO suplementada com 0,5%de tributirina

Ingredientes	Quantidade (g)	
	DIO	DIO + Tributirina 0,5%
Banha de porco	355,0	355,0
Groselha	310,0	310,0
Caseína	200,0	200,0
Amido de milho	62,0	62,0
Celulose	50,0	50,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Óleo de soja	20,0	20,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Cistina	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,50	2,50
BHT	0,014	0,014
Tributirina	0	0,5

BHT: hidroxitolueno butirato; DIO: dieta indutora de obesidade.

Tabela 2: Distribuição energética (% do valor calórico total) e densidade calórica das dietas DIO e DIO + TBT

	DIO	DIO + TBT
Carboidrato (% kcal totais)	23,3	23,2
Proteína (% kcal totais)	14,9	14,8
Lipídeos (% kcal totais)	61,8	62,4
Calorias/g	5,21	5,21

Notas: kcal: quilocalorias; DIO: dieta indutora de obesidade; TBT: Tributirina.

O controle da ingestão alimentar e a medição do peso corporal foram feitos semanalmente. Para obtenção do dado de ingestão alimentar por animal foi feita a diferença de peso dos potes com a dieta antes e após cada oferta de ração. O valor obtido era então dividido pelo número de animais correspondente a gaiola e então dividido pelo número de dias correspondente a esse balanço (em geral 7 dias). O mesmo procedimento foi feito para cálculo da água ingerida. Apenas o valor de um animal por cada gaiola foi computado para obtenção dos cálculos estatísticos.

Após 16 semanas e após jejum de 2,4 ou 14h, foi feita a eutanásia dos animais sob anestesia- ketamina (70mg/Kg) e xilazina (15mg/kg) para retirada de sangue e órgãos. O jejum de 14h foi feito para análise de butirato residual no intestino e região porta do fígado, além da retirada do tecido adiposo. O jejum de 2h antes da eutanásia foi feito nos experimentos de medida de translocação bacteriana e avaliação de permeabilidade intestinal. A administração de DTPA ou da *E.Coli* marcados com tecnécio foi feita após jejum de 4h por gavagem.

4.4 Retirada do tecido adiposo epididimal e cálculo de adiposidade

O tecido adiposo epididimal foi retirado para determinação do peso e em seguida cálculo através de uma regra de três para determinação da adiposidade onde: peso total do animal é cem por cento e multiplica-se então o peso do TAE por 100 e divide pelo peso total e com este resultado tem-se valor correspondente a adiposidade.

4.5 Análise de altura das vilosidade

O íleo foi retirado após a eutanásia e colocado em solução de formaldeído 10% por 24 horas e depois transferido para solução de álcool etílico 70%, onde permaneceu até o momento da inclusão. O tecido foi, então, incluído em paraplast (Paraplast Plus – Sigma #P3683) para cortes histológicos de 5µm e coloração com hematoxilina e eosina (HE).

Fotos de três campos representativos de cada amostra foram adquiridas em microscópico (Zeiss) acoplado com câmera digital (Axio Cam MRc) com objetiva de 10x. As imagens foram analisadas no software Image Pro Plus 6.3 (Media Cybernetics).

4.6 Quantificação de Butirato - por HPLC

Estômago, fígado (na região da veia porta) e ceco foram pesados em microtubos e 900 µL de ácido metafosfórico (-25%) foram adicionados. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 30 mim em uma temperatura ambiente. Em seguida foi feita centrifugação a 13.200 g por 30 mim. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 13.200 g por 20 mim e então congelado a - 20 °C. A concentração de ácidos graxos de cadeia curta foi determinada utilizando o aparelho SHIMADZU SPD-10A VP High Performance Liquid Chromatographer (HPLC) acoplado a detector de UV em comprimento de onda de 210 nm. Para realizar a

separação cromatográfica, 20 µL de amostra foi injetada no 101H SHIMADZU 30 cm x 7.9 mm SCR em uma coluna móvel a uma taxa de fluxo de 1.0 ml/min and 113 Kgf de pressão usando ácido metafosfórico a 1% como fase móvel (64).

4.7 Avaliação da permeabilidade intestinal por DTPA (^{99m}Tc)

Para determinação do tempo de coleta de sangue no experimento de permeabilidade intestinal, os animais (n=5) foram submetidos a 2h de jejum e previamente anestesiados (ketamina e xilazina) para eutanásia. Os animais foram posicionados em camas para retirada dos órgãos e obtenção das imagens foram retirados na seguinte ordem: estômago, intestino (duodeno, jejuno, íleo e ceco).

Foram feitas inicialmente as imagens na Gama Câmara após 4h por gavagem de 0.1 mL de Ácido Dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com tecnécio ^{99m}Tc . O ^{99m}Tc forma de pertecnato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) foi obtido do gerador de $^{99}\text{Molibdênio}/^{99m}\text{Tecnécio}$ (IPEN/CNEN, São Paulo, Brasil).

A gama câmara utilizada foi NucleineTM TH 22, Hungria. Janela de 20% de simetria foi utilizada para pico de energia de 140keV e colimador de baixa energia do tipo Low Energy High Resolution (LEHR) foi utilizado para direcionar os raios. As imagens foram obtidas durante 10 minutos e armazenadas em uma matriz 256 x 256 pixels. Com estes resultados foi possível determinar que tempo adequado para avaliação da permeabilidade intestinal deveria ser 4h e o outro tempo poderia ser 2h após a gavagem.

A avaliação da permeabilidade intestinal foi feita após 16 semanas experimentais. Os animais ficaram em jejum 2h antes da administração do DTPA marcado com tecnécio (^{99m}Tc) que foi feita através de gavagem e 4h após a coleta do sangue caudal foi retirado, em quantidade média de 50-100µl e colocados em tubos para leitura da radiação na a radioatividade determinada por contador gama (Wizard, Finlândia). Padrões de dose contendo a mesma quantidade de radioatividade administrada nos animais foram utilizados para corrigir o decaimento físico e para calcular o percentual da dose administrada.

Os resultados foram expressos como percentual da dose administrada por grama de tecido (% Dose/g), calculados pela seguinte equação:

$$\% \text{ Dose/g} = \frac{\text{cpm/g de órgão}}{\text{cpm da dose padrão}} \times 100 \quad \text{cpm} = \text{contagem por minuto}$$

4.8 Análise da amplificação de mRNA de proteínas da junção firme

A análise da expressão de proteínas da Junção firme ocludina, ZO-1 e da enzima MLCK foram feitas a partir da porção de íleo e congeladas imediatamente por nitrogênio líquido e em seguida preservadas no gelo seco. A porção do íleo foi colocada em tubo microtubos livre de RNase e congelados em nitrogênio líquido antes de serem armazenados a -70°C. Posteriormente, os tecidos foram submetidos a três etapas: 1. Extração do RNA; 2. Síntese do cDNA e 3. Amplificação do cDNA por PCR em tempo real (reação em cadeia da polimerase em tempo real).

4.8.1 Extração do RNA

Para extração do RNA, 50 a 100mg do íleo que foi homogeneizado com 1mL de trizol (Trizol Reagent, Invitrogen #15596). Após a homogeneização o tecido adiposo subcutâneo foi centrifugado a 13.000rpm, 4°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado.

Foram adicionados 200µL de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos, incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e novamente centrifugados a 13.000rpm, 4°C por 15 minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo contendo 500µL de isopropanol e misturadas por inversão durante um minuto. Em seguida, os tubos foram incubados a -70°C por 90 minutos, para precipitação do RNA.

As amostras foram, então, centrifugadas a 13.000rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet formado lavado com 1mL de etanol 75%. Após centrifugação por 10 minutos sob as mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem e centrifugação repetidos.

Novamente desprezou-se o sobrenadante e o pellet foi seco em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Depois de seco, o pellet foi ressuscitado em água e incubado em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Espectrofotômetro foi utilizado para determinação da concentração (ng/µL) e da pureza do RNA (por meio da razão 260/280) (Spectrophotometer ND-1000). Todos os materiais utilizados, incluindo microtubos, ponteiros e água foram livres de RNase e DNase.

4.8.2 Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA, o RNA extraído de cada amostra foi transcrito em cDNA por meio da transcriptase reversa (MMLV RT). Um micrograma do RNA foi diluído em 5µL de água livre de RNase e DNase. Adicionou-se 0,5µL de Oligo(dT)15 primer (Promega #C1101) e 1,25µL de água. Após homogeneização com a pipeta, os tubos foram colocados em termociclador a 72°C por 5 minutos (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems).

Em seguida, 3,25µL do mix contendo 0,5µL de M-MLV RT (Promega #M1705), 2µL de M-MLV 5x tampão, 0,5µL de dNTP Mix (Promega #U1515), 0,1µL de RNAsin (Ribonuclease inhibitor, Promega #N2511) e 0,25µL de água foram adicionado. Os tubos foram novamente colocados no termociclador a 42°C por três horas e, em seguida, 72°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação pela técnica de PCR em tempo real.

4.8.3 Amplificação do cDNA por PCR em tempo real

O cDNA sintetizado foi amplificado pela técnica de PCR em tempo real, utilizando específicos primers. As amostras foram diluídas em água livre de RNase (1:10) e 2,5µL foram adicionados à 7,5µL do mix em placa de 96 poços específica para PCR em tempo real. O mix foi composto de 0,75µL de primer forward, 0,75µL de primer reverse, 1µL de água e 5µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems #4367659).

A análise foi feita em máquina específica (ABiPrism – 7900HT Sequence Detection System) e analisados o programa SDS 2.4. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a quantidade de mRNA normalizada pelo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ($2^{-\Delta\Delta CT}$). A curva de dissociação indicou que um único produto de amplificação foi obtido em cada reação. A Tabela 3 mostra a sequência de nucleotídeos de cada primer utilizado.

Tabela 3: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para o PCR em tempo real no íleo.

Gene	Sequência foward	Sequência reverse
GAPDH	CTCAAGATTGTCAGCAATGC	CAGGATGCCCTTTAGTGGGC
OCLUDINA	ATGTCCGGCCGATGCTCTC	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT
ZO-1	CCAGCTTATGAAAGGGTTGTTC	TCCTCTCTTGCCAACTTTTCTC
MLCK	AGTTTGTGGCTCCTGAAGTGAT	AGTCCGCTGACCAGAATATAGC

ZO-1: Zônula ocludente 1; MLCK: Myosin light Chain Kinase.

4.9 Translocação Bacteriana

Para complementar a avaliação da permeabilidade intestinal, a translocação bacteriana foi verificada por meio de gavagem de *E.coli* marcada com tecnécio (^{99m}Tc). O tempo da gavagem até a coleta do sangue e dos órgãos foi o mesmo de 4h após a gavagem e 2h de jejum prévio.

4.9.1 Procedimento de marcação da *E. coli*

Para avaliação da translocação bacteriana foi utilizado a ^{99m}Tc -*E.coli* como radiotraçador sendo necessário inicialmente, a marcação da referida bactéria com o isótopo radioativo. Este procedimento foi realizado conforme descrito por DINIZ *et al.* (1999). De uma cultura mãe de *E. coli* foi feito o repique em agar tripticaseína (Merck). Após 18 horas de 50 crescimento a 37°C a bactéria foi transferida, para solução salina estéril e sua concentração ajustada espectrofotometricamente em 31% de transmitância a 580 nm, correspondente a 108 UFC/ml. Posteriormente, uma alíquota dessa suspensão bacteriana (2 ml) foi incubada em tubos contendo 1 ml de solução de cloreto estano (580 mM, pH 7,0) a 37° C por 10 min.

Após a incubação, 37,0-55,5 MBq de ^{99m}Tc , obtido por eluição do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ estéril (IPEN / Brasil) foi adicionado e a preparação foi mantida em 37° C por 10 min. Os tubos foram então centrifugados a 3.000 x g por 25 min. Este procedimento foi repetido três vezes. Após a última centrifugação, a radioatividade do sobrenadante e precipitado foi medida em calibrador de dose (CRC®-25R Dose Calibrator, Capintec, Ramsey, E.U.A.) e o percentual de ^{99m}Tc incorporado nas células bacterianas foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{marcação} = 100 \times \frac{\text{cpm (precipitado)}}{\text{cpm (precipitado + sobrenadante)}}$$

cpm = a contagem por minuto

4.9.2 Determinação da translocação bacteriana

Após 16 semanas e avaliação da permeabilidade intestinal, animais foram submetidos ao jejum de 2h e em seguida receberam 0,1 ml de suspensão contendo 1,8 MBq de ^{99m}Tc - *E.coli* que foi administrado por gavagem a todos os animais. Após 4h, os camundongos (10 e 11 animais por grupo, obeso e obeso TBT, respectivamente) foram submetidos ao procedimento com anestésico (ketamina e xilazina) e posteriormente à eutanásia com retirada de sangue, linfonodo mesentérico, fígado, baço e pulmões. Estes foram pesados e colocados em tubos apropriados para a determinação da radioatividade(65). As amostras foram contadas em um contador com cristal NaI (TI) (ANSRAbott, Chicago, E.U.A.). Os valores foram expressos em cpm/g ou ml.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram apresentados pela média e erro padrão e a normalidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson ou Kolmogorov-Sminorv quando o n foi menor que 8. A presença de *outliers* foi detectada pelo teste de Grubbs (variáveis paramétricas).

Os dados que assumiram a distribuição normal foram submetidos ao teste t de Student e os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney.

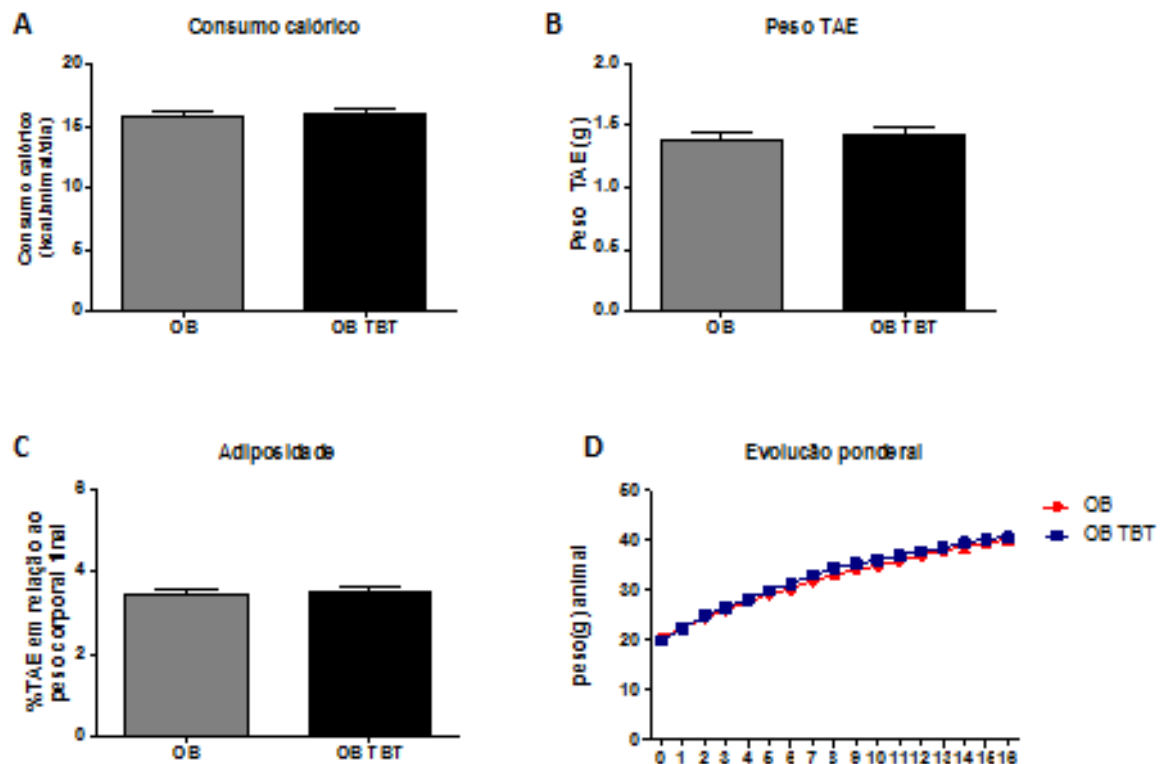
As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 e o nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Consumo calórico, evolução ponderal e adiposidade

O consumo calórico (Figura 4-A) bem como na evolução ponderal (Figura 4-B) foram semelhantes nos grupos obesos e obesos suplementados com tributirina. O peso do tecido adiposo epididimal (TAE) e a adiposidade relativa do grupo obeso com tributirina também foram similares em relação ao grupo obeso sem a suplementação (Figura 4-C,D).

Figura 4: Consumo calórico, evolução ponderal, tecido adiposo epididimal (TAE) e adiposidade



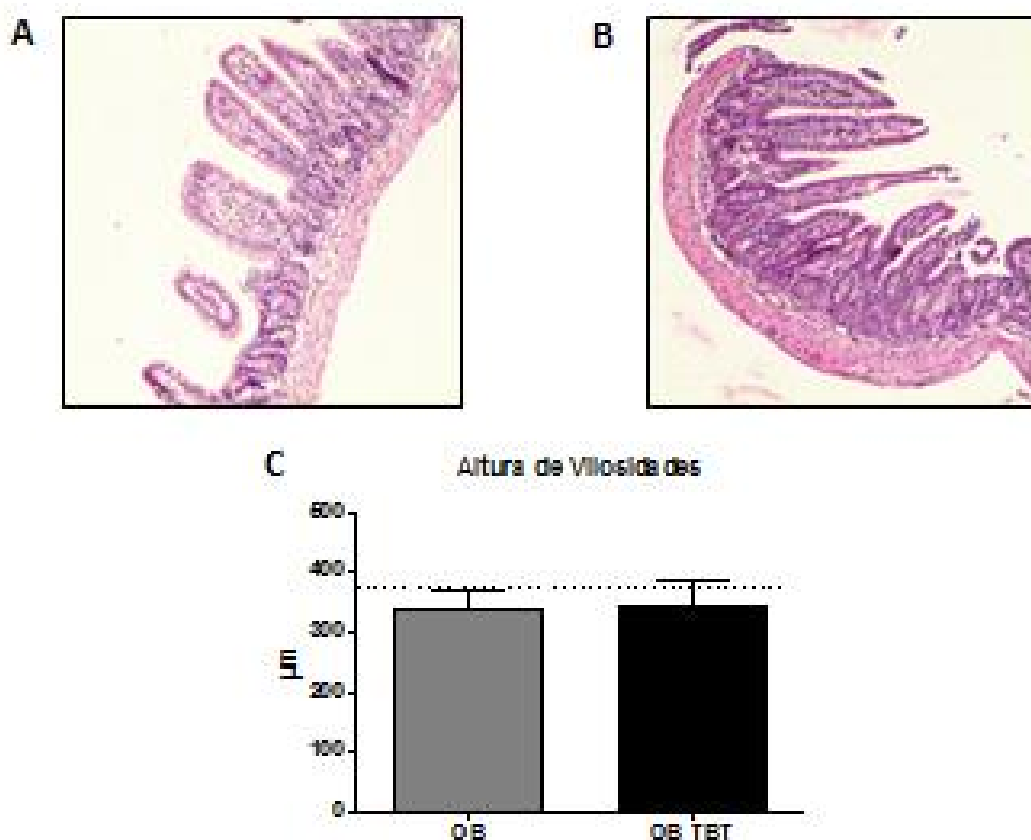
Notas: A – Consumo calórico de cada grupo calculado a partir de quilocalorias consumidas por cada animal por dia durante as 16 semanas experimentais. B – Peso do tecido adiposo epididimal (g) (TAE). C – Adiposidade calculada pelo percentual de peso de TAE em relação a peso corporal total. D - Peso corporal (g) em cada semana do período experimental.

OB = grupo obeso recebendo dieta indutora de obesidade (DIO) sem tributirina. **OB TBT** = grupo obeso recebendo DIO acrescida de TBT 0,5%. C – Peso do TAE. D - % Peso do TAE em relação ao peso corporal. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. n= 26/26. Teste t de student. *p<0,05.

5.2 Avaliação da altura de vilosidades

Para avaliar se houve qualquer alteração no aspecto histológico entre os grupos obesos com ou sem a suplementação da tributirina, mediu-se a altura das vilosidades entre os animais (Figura 5). Não houve diferença entre a altura das vilosidades entre os grupos e mesmo do grupo obeso comparado à uma faixa de normalidade para esse parâmetro, sugerindo que a tributirina não foi capaz de alterar este padrão.

Figura 5: Altura das vilosidades do íleo



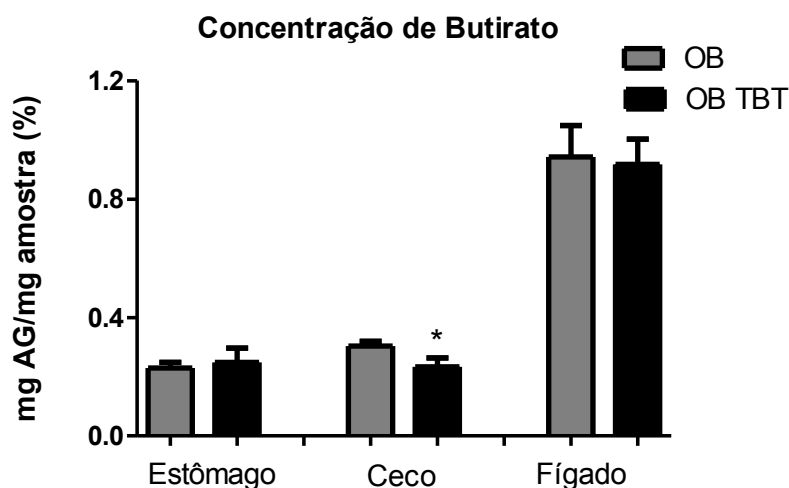
Notas: A, B – Micrografia do íleo corado com hematoxilina e eosina (HE); objetiva de 10X. A – Animal obeso. B – Animal obeso + tributirina a 0,5%. C – Medida da altura das vilosidades (μm). OB = grupo obeso recebendo dieta indutora de obesidade (DIO) sem tributirina. OB TBT = grupo obeso recebendo DIO acrescida de TBT 0,5%. n. =5/2. Teste t de student. *p<0,05.

5.3 Quantificação de butirato residual

A concentração de butirato (Figura 6) foi medida no estômago, ceco e fígado, na região da veia porta, 14h após jejum. Observou-se uma menor concentração de butirato no

ceco dos animais que receberam a suplementação. Os demais órgãos não apresentam diferença na concentração de butirato entre os grupos.

Figura 6: Concentração residual de butirato avaliada em estômago, ceco e fígado



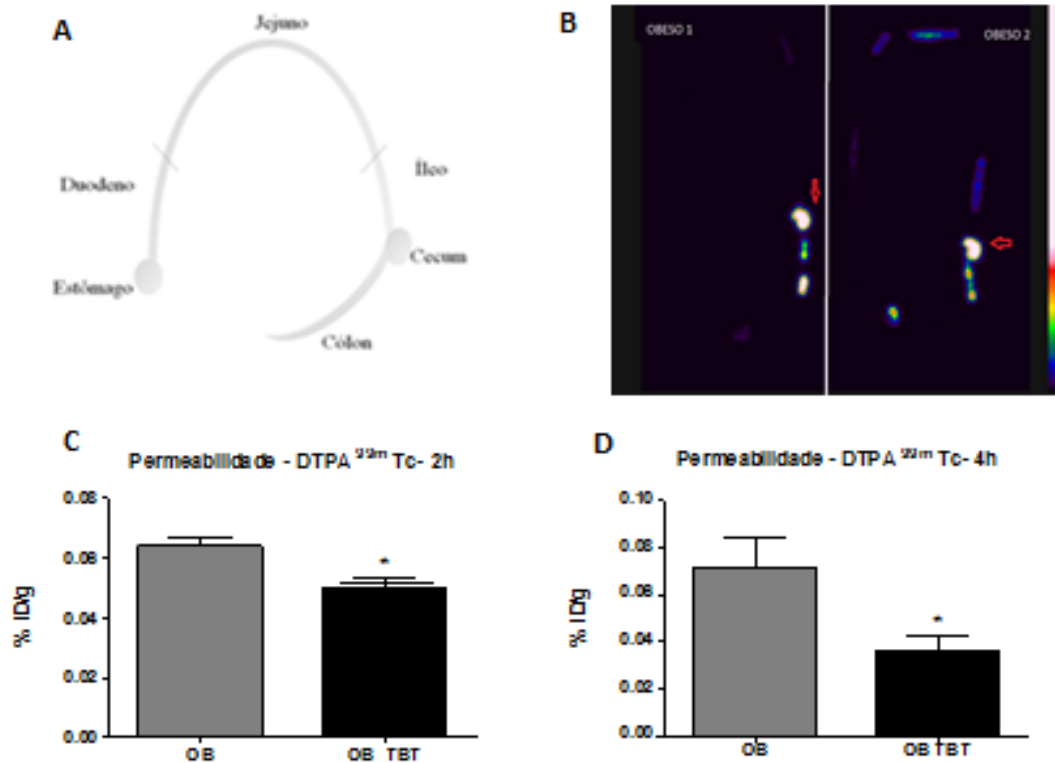
Notas: Medida da concentração residual de butirato (mg de ácido graxo/mg de amostra) em estômago, ceco e fígado após jejum de 14h por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão). **OB** = grupo obeso recebendo dieta indutora de obesidade (DIO) sem tributirina. **OB TBT** = grupo obeso recebendo DIO acrescida de TBT 0,5%. n= 8/9. Teste t de student. *p<0,05.

5.4 Avaliação da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana

O aumento da permeabilidade intestinal foi avaliado com 2h e 4h após a gavagem de Ácido Dietilenotriaminopentacético-(DTPA) marcado Tecnécio ^{99m}Tc para análise da detecção de difusão da radioatividade no sangue dos grupos obeso e obeso TBT. Inicialmente foram analisados os tempos mais apropriados para tal avaliação com base nas imagens do trato gastrointestinal (estômago e intestino) feitos com a gama câmara 4h após a gavagem do DTPA. Comprovou-se que neste tempo, pela localização da maior quantidade do DTPA no intestino delgado distal, o tempo adequado para coleta de sangue e avaliação da permeabilidade intestinal aumentada deveria ser no máximo 4h para que não houvesse perda dos dados.

Dessa forma, verificou-se que em 2h e 4h, houve aumento da permeabilidade intestinal e uma melhora no grupo obeso com tributirina em ambos os tempos avaliados como mostra a Figura 7.

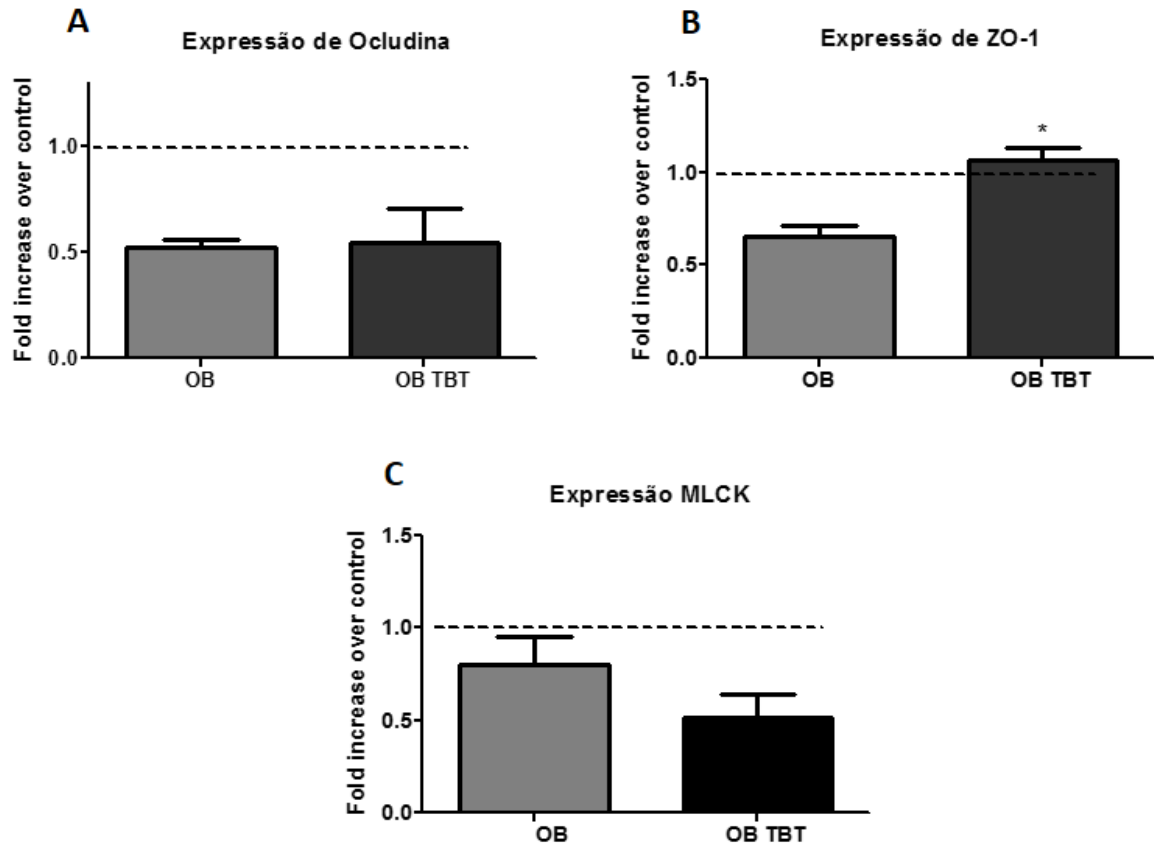
Figura 7: Avaliação da permeabilidade intestinal por ^{99m}Tc -DTPA 2h e 4h após gavagem



Notas: **A** – Desenho esquemático representando a disposição do trato gastrointestinal usado para realização das imagens cintilográficas. **B** - Imagens cintilográficas do trato gastrointestinal obtidas em gama câmara (Nucleine™ TH 22, Hungria) realizadas 4h após eutanásia para localização do. **C, D** - Medida de permeabilidade intestinal 2h (C) e 4h (D) após gavagem de ^{99m}Tc -DTPA por coleta de 50-100µl de sangue caudal e leitura da radiação por contador gama (Wizard, Finlândia). OB = grupo obeso recebendo dieta indutora de obesidade (DIO) sem tributirina. OB TBT = grupo obeso recebendo DIO acrescida de TBT 0,5%. n= 7/7. Teste t de student, *p<0,05.

Para complementar a avaliação da permeabilidade intestinal, também foi avaliada a expressão das proteínas das junções firmes, a ocludina, ZO-1 e a enzima MLCK. A ocludina teve a expressão diminuída em relação à normalidade (Figura 8-A). Já a expressão de ZO-1 foi menor no grupo com obesidade e essa alteração foi modificada no grupo suplementado com tributirina que apresentou melhora (Figura 8-B). Já a enzima MLCK não teve mudança na sua expressão em ambos os grupos (Figura 8-C).

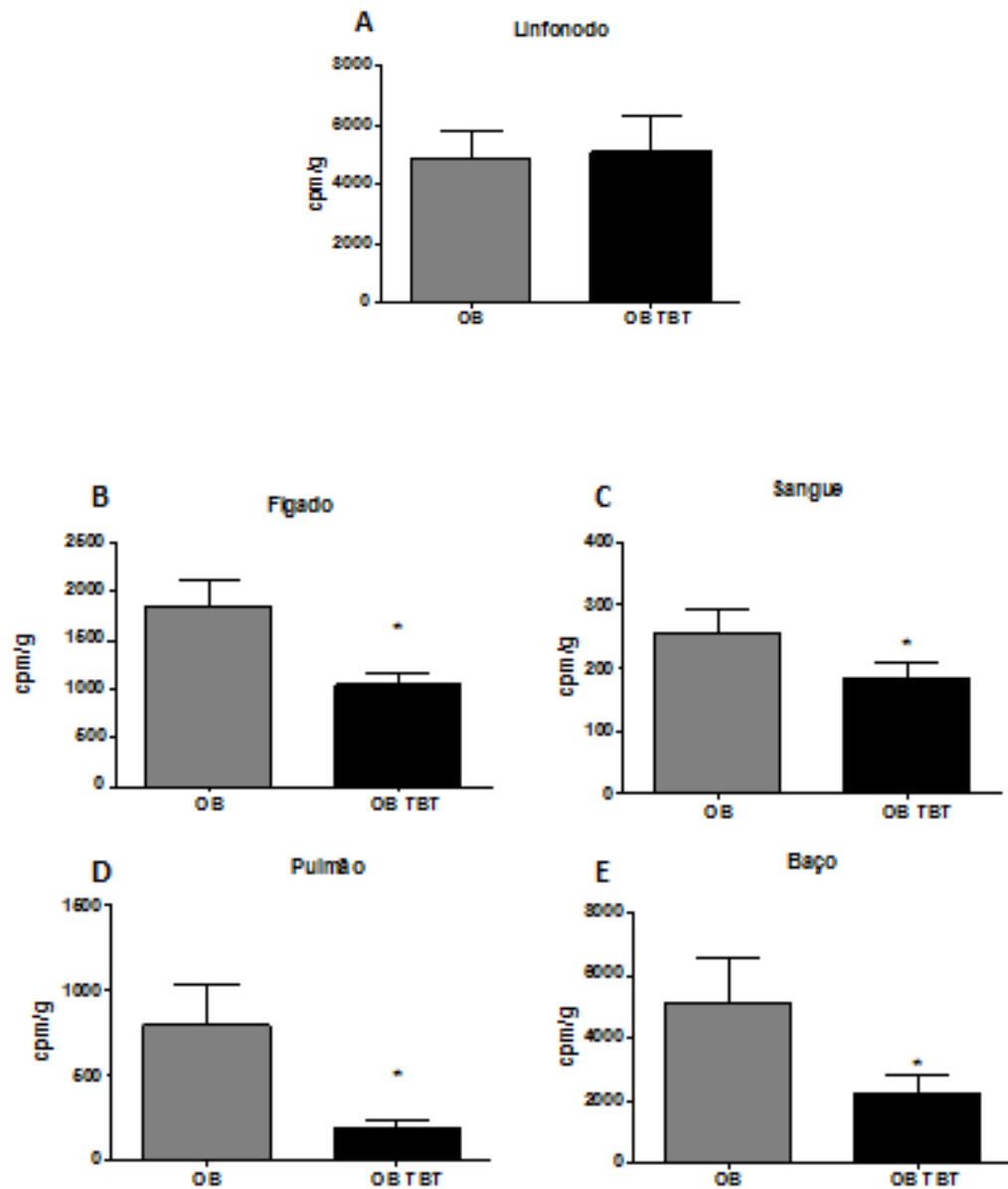
Figura 8: Avaliação da expressão das proteínas da junção firme (occludina e ZO-1) e da enzima MLCK no íleo por PCR em tempo real



Notas: A – Expressão de ocludina no íleo. B – Expressão de ZO-1(zonula ocludente- 1) no íleo. C – Expressão da enzima MLCK (Myosin light chain kinase) no íleo. OB = grupo obeso recebendo dieta indutora de obesidade (DIO) sem tributirina. OB TBT = grupo obeso recebendo DIO acrescida de TBT 0,5%. n =9/8. Teste t de student, *p<0,05

Em seguida, translocação bacteriana foi avaliada após a gavagem de *E.coli* marcada com Tecnécio (^{99m}Tc). Em todos os órgãos analisados (Figura 9-B,C,D,E) exceto linfonodos mesentéricos (Figura 9-A) observa-se uma menor presença de bactérias marcadas sugerindo o efeito da tributirina em reduzir translocação bacteriana.

Figura 9: Avaliação de translocação bacteriana por ^{99m}Tc -*E. coli* em linfonodo, fígado, sangue, pulmão e baço



Notas: A medida da translocação bacteriana foi realizada em linfonodo mesentérico (A), fígado (B), sangue caudal (C), pulmão (D) e baço (E) 4h após gavagem de *E. Coli* marcada com tecnécio (^{99m}Tc) e leitura da radiação por contador gama (Wizard, Finlândia). OB = grupo obeso recebendo dieta indutora de obesidade (DIO) sem tributirina. OB TBT = grupo obeso recebendo DIO acrescida de TBT 0,5%. n =10/11. Teste t de student, *p<0,05.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a suplementação de tributirina é capaz de reduzir a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana vistas na obesidade, por um mecanismo que envolve o aumento da proteína da junção firme zônula ocludente (ZO-1).

Vários esforços têm sido feitos para entender os mecanismos de controle e quais ferramentas podem auxiliar no manejo e tratamento da obesidade. Nesse contexto, o butirato e a tributirina estão sendo estudados em seus vários aspectos. Vinolo *et al.* (9) observaram melhora de resistência à insulina e redução na inflamação associada à obesidade com a suplementação de tributirina, no entanto os autores não avaliaram a diminuição da permeabilidade intestinal nesse trabalho. Outro estudo, desenvolvido por Myoshi *et al.* (11) também verificaram que a suplementação com a tributirina foi capaz de reduzir injúria hepática resultante de endotoxemia metabólica, no entanto também não avaliaram permeabilidade intestinal que está associada a propensão à endotoxemia nessa condição. De forma complementar a esses estudos anteriores com a suplementação de tributirina, o nosso presente trabalho buscou identificar o papel desse triglicerídeo na redução da permeabilidade intestinal que não havia sido avaliado anteriormente de forma específica na obesidade.

Em nosso estudo não foram observadas mudanças nos parâmetros de evolução ponderal e adiposidade entre os grupos obesos com ou sem a suplementação. Um resultado divergente foi visto por Vinolo *et al.* (9) que observaram em camundongos C57BL/6 que o tratamento com tributirina atenuou o ganho de peso e de tecido adiposo em animais com obesidade induzida por dieta. As diferenças entre os resultados podem ser devidas ao modo de administração da TBT. No estudo de Vinolo, TBT foi dada por gavagem a cada 48 h durante um período de 10 semanas e em concentração de 2g/kg/peso do animal.

Até o momento, os trabalhos que utilizam a administração de tributirina não possuem uma metodologia semelhante ao nosso trabalho e, portanto, apresentam resultados divergentes ou improváveis para comparação. A administração da tributirina por gavagem, onde a concentração é definida por kg/peso corporal do animal, pode ter impacto em diminuir peso do animal como foi visto por Vinolo (9) uma vez que a cada semana o animal ganha peso e recebe um aumento na suplementação que é decorrente do seu ganho de peso. Com base no estudo de Vinolo, no nosso trabalho e tendo em vista outros estudos que utilizam dosagens menores e não encontraram redução no peso, supõe-se que a tributirina parece exercer esse efeito quando administrada em dosagens semelhantes a 2g/Kg/peso do animal.

Embora o estudo acima tenha mostrado um possível efeito protetor da tributirina no ganho de peso, não foi mostrado nenhum mecanismo claro que a relaciona com a indução de perda de peso. Por outro lado Cresci *et al.* (66) avaliando a suplementação de tributirina por gavagem entre valores que variaram de 0,83 a 10 mM, não observaram alterações no peso corporal, embora tenha sido demonstrada melhora de parâmetros relacionados à junção firme, como o aumento da expressão de ZO-1, corroborando com os nossos resultados. Myoshi *et al.* (11) também não observaram perda de peso embora tenham usado a gavagem como método de administração e um período experimental semelhante ao utilizado por Vinolo, no entanto o que poderia justificar é o uso de uma dosagem de tributirina de apenas 1g/kg/peso do animal.

Nossos dados estão de acordo com os descritos anteriormente na literatura. Mostramos que a absorção de butirato ocorre rapidamente, sendo que após 14 de jejum não há diferenças na concentração de butirato no estômago e na região hepática da veia porta. Porém animais que receberam a suplementação de tributirina tiveram menor concentração de butirato no ceco, sugerindo que possa ter havido maior absorção no intestino proximal. Este fato pode ter sido devido à capacidade do butirato em regular positivamente o mRNA do seu receptor, MCT-1 como mostrado previamente (46, 67). Cuff *et al.* (46) desenvolveram o primeiro trabalho que mostrou a regulação da expressão de MCT-1 exclusiva do butirato. Os autores mostraram que por dose dependente, butirato pode aumentar a abundância do mRNA de MCT-1 tanto pela da transcrição gênica quanto pela estabilidade do mRNA. Viram ainda que o aumento na indução da proteína de MCT-1 foi capaz de aumentar o transporte de butirato, que teve uma taxa de captação cinco vezes maior. Então, concluíram a partir desses resultados que o butirato é capaz de aumentar a sua disponibilidade via regulação do seu receptor. Outro estudo desenvolvido por Borthurkatur *et al.* (67) verificou de forma detalhada como butirato regula positivamente o seu receptor através da identificação de uma região promotora em MCT-1. Com esses dados, viram em experimento *in vitro* que o butirato é capaz de estimular a atividade dessa região em MCT-1 aumentando por dose dependente sua transcrição. Com os estudos acima e os dados da absorção de butirato no ceco verificados em ambos os grupos do nosso estudo, podemos entender que a suplementação de tributirina pôde exercer esse efeito de regulação positiva, promovendo o aumento absorção de butirato por mecanismo descrito pela literatura, onde butirato é capaz de regular positivamente seu receptor, aumentando a taxa de captação de butirato, o número de receptores, o que torna favorável uma maior absorção.

A redução da permeabilidade intestinal sugerida pela maior expressão de ZO-1 pode ser confirmada pelos resultados de permeabilidade intestinal obtidos pela administração de DTPA marcado com tecnécio (^{99m}Tc). Nossos resultados mostram uma redução da

permeabilidade após 2h e 4h após administração do radiofármaco e coleta do sangue para essa avaliação. Resultados semelhantes em estudo com camundongo foram vistos por Cresci *et al.* (66) que constataram que a tributirina foi capaz de melhorar a expressão de ZO-1, além de reverter danos relacionados à montagem da barreira. Através de imagens obtidas por imunohistoquímica, foi possível a esses autores detectar alteração na co-localização de ZO-1 com ocludina e demonstrar a sua reversão com uso de tributirina, o que é crucial para montagem e manutenção da integridade da barreira.

Embora outros estudos tenham sido realizados *in vitro*, outros resultados semelhantes foram vistos em relação aos efeitos do butirato na melhora da permeabilidade intestinal. Estudos prévios mostraram que o butirato é capaz de atenuar o dano da barreira intestinal. Vias de sinalização envolvem a montagem, desmontagem e a manutenção das junções firmes são controladas por várias moléculas de sinalização como proteína quinase ativada por mitógeno (AMPK), proteína quinase C (protein kinase C-PKC) (68). Em um estudo *in vitro* desenvolvido por Peng *et al.* (69) foi constatado o papel de butirato em facilitar a montagem das junções firmes que ocorre via ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (activated mitogen protein kinase – AMPK). Foi constatado que butirato aumenta a atividade de AMPK o que acelera a reorganização das junções firmes e montagem da barreira por translocação de proteínas da junção firme como a ZO-1 e a ocludina, do citoplasma para a junção. Esse mecanismo no controle das junções firmes foi visto anteriormente por um estudo desenvolvido por Zhang *et al.* (70) que demonstrou que AMPK é ativada durante a indução de cálcio na montagem da barreira e isso ocorre quando há a reorganização da ZO-1 e o estabelecimento da resistência transepitelial.

Outro estudo desenvolvido por Wang *et al.* (57) também comprovou com experimento *in vitro* o papel de butirato em melhorar a função da barreira intestinal. Nesse estudo eles identificaram que butirato é capaz de aumentar a transcrição de claudina-1, outra proteína relacionada a regulação da barreira, e verificaram ainda que, ao silenciar o gene da proteína a diminuição na sua expressão está relacionada a mudança na integridade por interferir na redistribuição de ocludina e ZO-1. Esses mecanismos descritos na literatura corroboram e sugerem de que forma butirato pode diminuir a permeabilidade intestinal verificada em nossos resultados.

Somado aos resultados de permeabilidade encontrados no experimento com tecnécio (^{99m}Tc), a alteração da integridade da barreira intestinal também foi verificada em nosso estudo, com análise de expressão das proteínas de junção firme. Na literatura o butirato tem sido descrito em atenuar essas alterações da integridade da barreira (57, 68). Confirmamos

essa hipótese com o presente trabalho já que a tributirina foi capaz de melhorar a diminuição da expressão de ZO-1. Em relação à ocludina, o mesmo efeito não pode ser visto. Provavelmente a diferença entre estes resultados se deve ao fato de que os componentes da junção firme são compreendidos por múltiplas interações transmembrana e proteínas citoplasmáticas que estão ligadas ao citoesqueleto de actina, o que demonstra uma diferença pequena na localização e papel de ZO-1 e ocludina. Além disso, a forma de controle específica que é exercida pelas proteínas da junção firme em relação à barreira intestinal ainda não está totalmente esclarecida na maioria dos estudos e apesar de formarem um complexo estável desempenham funções diferentes e podem ser reguladas de forma individual por estímulos diversos como ações de citocinas, bloqueadores e outros (16, 71).

A ZO-1 desempenha importante papel tanto na montagem quanto na manutenção da barreira, pois ela pertence à família das proteínas zônulas ocludentes (1,2,3) que se ligam tanto aos componentes citosólicos quanto aos transmembrana que regulam a barreira. ZO-1 desempenha uma função de ancoramento de outras proteínas como a ocludina no filamento de actina presente no anel perijuncional que regula a permeabilidade (4, 17). Em relação ao aumento na expressão de ZO-1, nós hipotetizamos que mais butirato estaria disponível nos enterócitos e poderia assim interferir na expressão de algumas proteínas da junção firme, como o aumento na expressão de ZO-1. Essa associação entre butirato e ZO-1 já havia sido descrita anteriormente no estudo desenvolvido por Bordin *et al.* (56), no qual observaram o efeito de butirato em inibir a histona desacetilase e portanto controlar a barreira intestinal principalmente pela via de expressão de proteínas da zônula ocludente, ZO1,2 e 3 e cingulina, uma outra proteína capaz de regular as junções firmes.

Fanning *et al.* (17) esclareceram um importante papel de ZO-1, sua ligação com filamento de actina. Os autores identificaram uma região de aminoácidos em ZO-1 que seria responsável por integrar a proteína ao filamento. A partir da análise dessa ligação, os autores concluíram que essa interação direta exerce papel na montagem da barreira em diversas etapas, uma vez que verificaram que, na ausência dessa região ligante de actina (actin binding region-ABR), embora não ocorra mudança na localização de ZO-1 na junção firme, ocorre a interação de ZO-1 com f-actina por regulação de ABR, que é que promove o contato inicial célula-célula para a montagem da barreira.

Além da ZO-1, a ocludina e a MLCK também são componentes importantes da junção firme estudados nesse trabalho. A ocludina, descoberta na década de 1990 é uma proteína transmembrana cuja função não está totalmente esclarecida (4). Sabe-se que ela possui um domínio que se liga a ZO-1 para que essa última então ela se ligue ao citoesqueleto de actina.

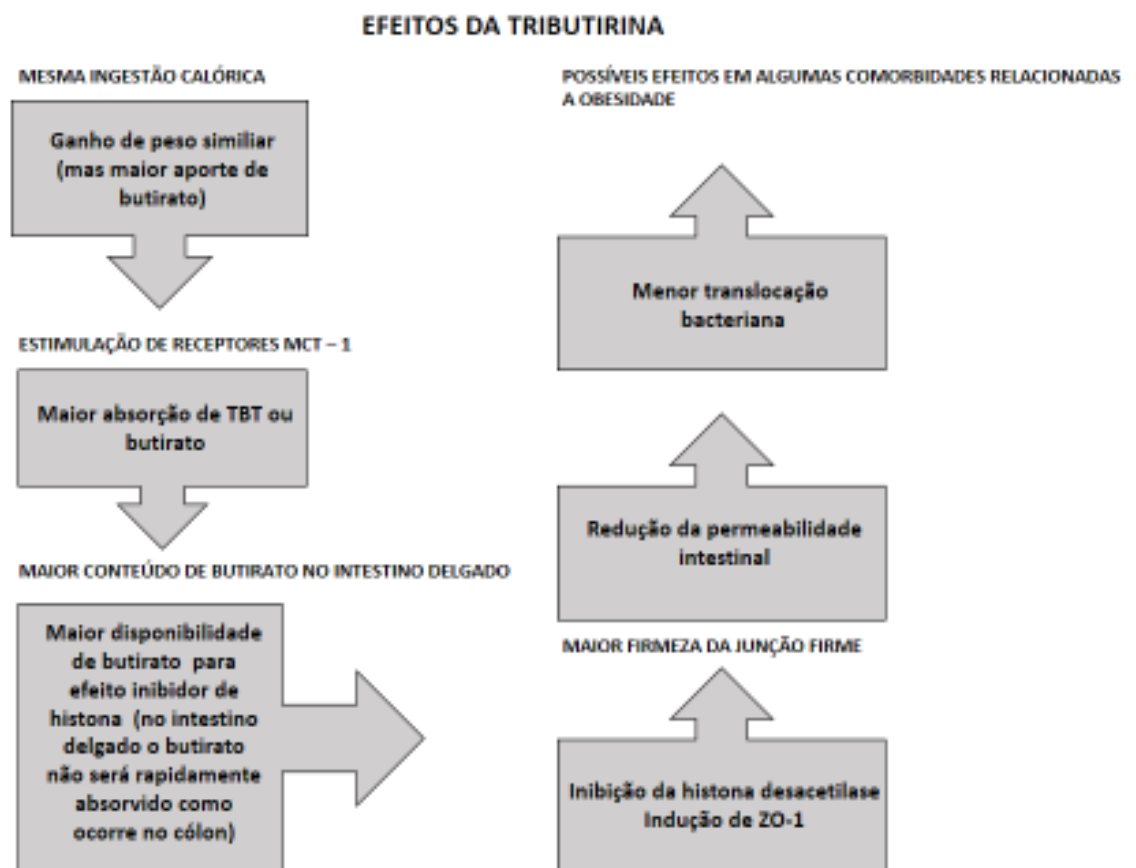
Dessa forma, nossos resultados sugerem que a mudança na permeabilidade intestinal teve efeito do butirato de forma específica para regulação na expressão de ZO-1. Tendo em vista as funções de ZO-1 discutidas com base na literatura, podemos associar que sua regulação se torna importante e significativa para melhora da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana. Nos trabalhos aqui citados, podemos entender que com os resultados apresentados por eles, a alteração em proteínas transmembranas como ocludina e claudina-1 parecem estar sempre ligadas a regulação inicial de ZO-1 (56, 57, 70).

A MLCK possui papel importante na regulação do anel perinjuncional uma vez que pode fosforilar a cadeia leve da miosina e então aumentar o espaço paracelular, o que ocasiona em maior permeabilidade (18). Embora mudança na expressão de MLCK não foi detectada, a fosforilação de MLC poderia ter sido influenciada pela tributirina, exercendo efeito protetor.

A tributirina e o butirato têm sido alvos de estudos relacionados ao controle de peso na obesidade induzida por dieta. (8, 9). No entanto, até o momento os efeitos de TBT na translocação bacteriana relacionada à obesidade não havia sido estudado. Nós mostramos que a translocação bacteriana pode ser diminuída com uso de TBT. Exceto no linfonodo mesentérico, que a presença de bactérias foi menor que em todos os órgãos testados. Esse fato de não haver mudança no linfonodo mesentérico, pode ser justificado por duas hipóteses. Inicialmente temos que a via linfática é a primeira via que teria presença de bactérias pelo conceito de translocação bacteriana via intestino (72). No entanto, no presente trabalho, sabemos que a translocação foi mediada por dano da mucosa intestinal e provável passagem paracelular das bactérias diretamente para a via sanguínea (30). Isso justificaria a falta de diferença entre os grupos Obeso e Obeso TBT da bactéria translocada para o linfonodo, em contraste com os demais tecidos.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostram que a administração da tributirina em 0,5% reduz a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana em animais com obesidade induzida pela dieta. Esse efeito não é devido à diminuição do peso corporal, mas por um processo que envolve o aumento da expressão da proteína da junção firme ZO-1.



REFERÊNCIAS

1. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
2. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, *et al*. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
3. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*. 2011;130(2):202-12.
4. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70 (4):631-59.
5. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(2):G440-8.
6. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7(10):e47713.
7. Leonel AJ, Teixeira LG, Oliveira RP, Santiago AF, Batista NV, Ferreira TR, *et al*. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. *Br J Nutr*. 2013;109(8):1396-407.
8. Lin HV, Frassetto A, Kowalik EJ, 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.
9. Vinolo MA, Rodrigues HG, Festuccia WT, Crisma AR, Alves VS, Martins AR, *et al*. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303(2):E272-82.
10. Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*. 2011;3(10):858-76.
11. Miyoshi M, Sakaki H, Usami M, Iizuka N, Shuno K, Aoyama M, *et al*. Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *Clin Nutr*. 2011;30(2):252-8.

12. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(11):799-809.
13. Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003;17(3):397-425.
14. Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(5):479-97.
15. Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res.* 2015;13(1):11-8.
16. Weber CR. Dynamic properties of the tight junction barrier. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1257:77-84.
17. Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* 2002;16(13):1835-7.
18. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, *et al.* TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(3):G367-76.
19. Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(5):G851-7.
20. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Clevea R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(4):464-71.
21. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palù G, *et al.* Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(2):G518-25.
22. Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:19.
23. Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, Gotteland M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32(11-12):1307-14.
24. Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol.* 2014;5:190.

25. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
26. Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef Microbes*. 2014;5(1):3-17.
27. Lam YY, Ha CW, Campbell CR, Mitchell AJ, Dinudom A, Oscarsson J, *et al.* Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2012;7(3):e34233.
28. Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(9):639-47.
29. MacFie J, Reddy BS, Gatt M, Jain PK, Sowdi R, Mitchell CJ. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br J Surg*. 2006;93(1):87-93.
30. Deitch EA, Berg R. Bacterial translocation from the gut: a mechanism of infection. *J Burn Care Rehabil*. 1987;8(6):475-82.
31. Alisi A, Ceccarelli S, Panera N, Nobili V. Causative role of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:132.
32. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, *et al.* Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med*. 2011;3(9):559-72.
33. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-23.
34. Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest*. 2004;84(3):282-91.
35. McAllan L, Skuse P, Cotter PD, O'Connor P, Cryan JF, Ross RP, *et al.* Protein quality and the protein to carbohydrate ratio within a high fat diet influences energy balance and the gut microbiota in C57BL/6J mice. *PLoS One*. 2014;9(2):e88904.
36. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
37. Ley RE, Bäckhed 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.

38. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
39. Mujico JR, Baccan GC, Gheorghe A, Díaz LE, Marcos A. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *Br J Nutr*. 2013;110(4):711-20.
40. Remely M, Tesar I, Hippe B, Gnauer S, Rust P, Haslberger AG. Gut microbiota composition correlates with changes in body fat content due to weight loss. *Benef Microbes*. 2015;6(4):431-9.
41. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(2):104-19.
42. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(4):1073-8.
43. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998;12(6):499-507.
44. Gill RK, Saksena S, Alrefai WA, Sarwar Z, Goldstein JL, Carroll RE, *et al*. Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(4):C846-52.
45. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life*. 2012;64(1):1-9.
46. Cuff MA, Shirazi-Beechey SP. The human monocarboxylate transporter, MCT1: genomic organization and promoter analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(4):1048-56.
47. Ulven T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:111.
48. li Cj. Butyrate: food sources, function and health benefits2014.
49. Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*. 2013;145(2):396-406.e1-10.
50. Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*. 2003;133(7 Suppl):2485S-93S.
51. Gill RK, Dudeja PK. A novel facet to consider for the effects of butyrate on its target cells. Focus on "The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(5):C977-9.

52. Vinolo MA, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem.* 2011;22(9):849-55.
53. Aguilar EC, Leonel AJ, Teixeira LG, Silva AR, Silva JF, Pelaez JM, *et al.* Butyrate impairs atherogenesis by reducing plaque inflammation and vulnerability and decreasing NF κ B activation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(6):606-13.
54. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RR, Cara DC, Cardoso VN, *et al.* Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. *Lipids.* 2012;47(7):669-78.
55. Huang XZ, Li ZR, Zhu LB, Huang HY, Hou LL, Lin J. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates butyrate-induced intestinal barrier impairment in a Caco-2 cell monolayer model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59(2):264-9.
56. Bordin M, D'Atri F, Guillemot L, Citi S. Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins. *Mol Cancer Res.* 2004;2(12):692-701.
57. Wang HB, Wang PY, Wang X, Wan YL, Liu YC. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci.* 2012;57(12):3126-35.
58. Kinoshita M, Suzuki Y, Saito Y. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR γ activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(2):827-31.
59. Wächtershäuser A, Loitsch SM, Stein J. PPAR- γ is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272(2):380-5.
60. Egorin MJ, Yuan ZM, Sentz DL, Plaisance K, Eiseman JL. Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43(6):445-53.
61. Chen ZX, Breitman TR. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. *Cancer Res.* 1994;54(13):3494-9.
62. Gaschott T, Steinhilber D, Milovic V, Stein J. Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. *J Nutr.* 2001;131(6):1839-43.
63. Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, *et al.* A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;42(2):150-7.

64. Smiricky-Tjardes MR, Flickinger EA, Grieshop CM, Bauer LL, Murphy MR, Fahey GC. In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. *J Anim Sci.* 2003;81(10):2505-14.
65. Quirino IE, Correia MI, Cardoso VN. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clin Nutr.* 2007;26(3):335-40.
66. Cresci GA, Bush K, Nagy LE. Tributyrin supplementation protects mice from acute ethanol-induced gut injury. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014;38(6):1489-501.
67. Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem.* 2008;103(5):1452-63.
68. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr.* 2011;141(5):769-76.
69. Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr.* 2009;139(9):1619-25.
70. Zhang L, Li J, Young LH, Caplan MJ. AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(46):17272-7.
71. Shen L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1258:9-18.
72. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun.* 1979;23(2):403-11.

ANEXO

ANEXO A: Certificado de aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DE
MINAS GERAIS**

**CEUA
COMISSÃO DE
ÉTICA NO USO DE
ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 230 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Influência da obesidade na permeabilidade intestinal e os possíveis efeitos moduladores da tributirina", que tem como responsável Jacqueline Isaura Alvarez Leite, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/11/2013.

Este certificado espira-se em 05/11/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 230 / 2013, related to the Project entitled "Influence of obesity on intestinal permeability and the possible modulatory effects of tributyrin", under the supervision of Jacqueline Isaura Alvarez Leite, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/11/2013. This certificates expires in 05/11/2018.