

## PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

Enviar duas vias para a CEUA-UERJ na secretaria do IBRAG

USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO

PROTOCOLO Nº

RECEBIDO EM: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**ATENÇÃO 1:** antes de preencher o formulário, leia o manual. Caso as informações solicitadas não sejam **INTEGRALMENTE** apresentadas conforme indicado no manual, o formulário será devolvido para correção e uma nova análise terá que aguardar a próxima reunião da CEUA-UERJ.

**ATENÇÃO 2:** o formulário deverá ser preenchido integralmente com o uso de um computador. A assinatura deve ser original. É vedado o uso de assinatura eletrônica (digitalizada).

# FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

## 1. PROJETO

EFEITOS DA CAPSAICINA E DE AGONISTAS PPAR NO REMODELAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO, FÍGADO E INTESTINO DE CAMIUNDONGOS ALIMENTADOS COM EXCESSO DE LIPÍDIOS OU FRUTOSE

Área do conhecimento: 20601000 CITOLOGIA E BIOLOGIA CELULAR

Lista das áreas do conhecimento disponível em: <http://www.capes.gov.br/avaliacao/tabela-de-areas-de-conhecimento>

Finalidade: Pesquisa

Ensino

Treinamento

**Atenção:** A data de início previsto deverá ser, no mínimo, de 2 meses posterior à entrega do formulário para a avaliação da CEUA-UERJ.

Início: 01 / 10 / 2018

Término: 01 / 10 / 2022

## 2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Nome completo	Vanessa de Souza Mello
Instituição	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Unidade	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Departamento	Departamento de Anatomia
Laboratório	Laboratório de Morfometria Metabolismo e Doenças Cardiovasculares
Telefone	(21)2868-8689
E-mail	v.souzamello@gmail.com

### Vínculo com a instituição:

- Docente permanente
- Professor visitante
- Pesquisador visitante
- Técnico de nível superior
- Pós-doutor

### Experiência prévia:

Experiência adquirida com pesquisa neste modelo experimental durante o desenvolvimento dos projetos de Mestrado, Doutorado e Pós-doutorado realizados no Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares. Como docente, já atua desde 2012.

Tempo de experiência (anos): 14

### 3. COLABORADORES

Nome completo	Tamiris Lima Rachid	
Instituição	Universidade do Estado do Rio de Janeiro	
Nível acadêmico	Doutoranda	
Telefone	(21) 99974-4511	
E-mail	<a href="mailto:tamirachid@gmail.com">tamirachid@gmail.com</a>	
Experiência prévia	Sim	<input checked="" type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Caso afirmativo, descreva tipo e tempo		
8 anos. 3 anos de iniciação científica, 2 anos como mestranda e 3 anos como doutoranda, com a supervisão da orientadora.		

Nome completo	Flavia Maria da Silva Veiga	
Instituição	Universidade do Estado do Rio de Janeiro	
Nível acadêmico	Doutoranda	
Telefone	(21) 97926-2277	
E-mail	<a href="mailto:flavia_veiga@hotmail.com">flavia_veiga@hotmail.com</a>	
Experiência prévia	Sim	<input checked="" type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Caso afirmativo, descreva tipo e tempo		
3 anos. 1 ano de estágio probatório sob supervisão de Vanessa de Souza Mello e 2 anos como mestranda.		

Nome completo	Carolline dos Santos Miranda	
Instituição	Universidade do Estado do Rio de Janeiro	
Nível acadêmico	Mestranda	
Telefone	(21) 98277-2302	
E-mail	<a href="mailto:carolmiranda93@gmail.com">carolmiranda93@gmail.com</a>	
Experiência prévia	Sim	<input checked="" type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Caso afirmativo, descreva tipo e tempo		
4 anos como aluna de iniciação científica sob supervisão de Vanessa de Souza Mello.		

Utilize as tabelas acima para o preenchimento dos colaboradores. Copie, cole abaixo e preencha quantas forem necessárias, até que todos os colaboradores sejam contemplados.

### 4. RESUMO DO PROJETO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo acúmulo intra-hepático de lipídios, presente em 75-100% dos indivíduos obesos, sendo considerada o componente hepático da síndrome metabólica. Um conceito inovador propõe que o eixo intestino-fígado desempenha papel fundamental na gênese e progressão da DHGNA, pois o excesso do consumo de gordura saturada ou de frutose altera a composição da microbiota intestinal (disbiose) e aumenta a permeabilidade da barreira intestinal. Dessa forma, ocorre translocação de bactérias e toxinas produzidas por elas do lumen intestinal para o sangue, com consequências para o metabolismo.

O trato digestório é povoado por diversos microorganismos, principalmente por bactérias dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que são influenciadas pela qualidade da dieta. O excesso de gordura saturada ou de frutose compromete a homeostase energética hepática, pois favorecem a lipogênese, e estimula a produção de lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina, pela microbiota intestinal. Altos níveis de LPS induzem inflamação de baixo grau, que compromete a integridade da mucosa por alterações nas proteínas estruturais das zônulas de oclusão e aumento da permeabilidade intestinal. A disbiose produzida por inadequações nutricionais podem afetar o fígado por migração do LPS (endotoxina) via veia porta, levando à endotoxemia.

Além da endotoxemia, a dieta hiperlipídica promove redução da densidade numérica de

mitocôndrias, com prejuízo à beta-oxidação, e resistência à insulina, com função reduzida do retículo endoplasmático (RE) no processamento pós-traducional das proteínas e o consequente estresse do RE (ERE). Ambos estímulos aumentam as espécies reativas de oxigênio (EROs) e resultam em estímulos pró-apoptóticos e morte celular, além de induzir a produção de LPS. O influxo do LPS e de DNA bacteriano para o fígado pela circulação portal aumenta a expressão dos receptores *toll like 4* (TLR4), resultando na ativação do fator de transcrição NF-Kb, produção de TNF-alfa e indução da SOCS-3, com consequente prejuízo à sinalização hepática da insulina e aumento da produção de EROs. Dessa forma, o LPS estimula a inflamação hepática e o estresse oxidativo (EO) crônico, favorecendo a progressão da DHGNA para formas mais graves como a esteatohepatite (EHNA) e a cirrose.

Dietas ricas em frutose ou em gordura saturada aumentam a endotoxemia pós-prandial, com efeitos cumulativos quando consumidas cronicamente. Estudos em camundongos mostram aumento na contagem de macrófagos intestinais e maior expressão de TLR4 no fígado, estimulada pelo aumento de LPS plasmático após o consumo de dieta rica em frutose. A disbiose promovida pelo consumo crônico excessivo de frutose ou lipídios é geralmente demonstrada por um aumento da razão *Firmicutes / Bacteroidetes* que, além de induzir o binômio inflamação e estresse oxidativo, desencadeia a esteatose hepática por mecanismos associados ao aumento da extração de energia alimentar e favorecimento da lipogênese. Diante deste cenário, a utilização de fármacos ou nutracêuticos que revertam a disbiose e contenham as alterações hepáticas advindas do excesso dietético de frutose ou gordura saturada são pertinentes dada a elevada prevalência de DHGNA na população obesa e sua progressão deletéria à saúde.

Além disso, recentemente foi feita uma projeção de que a presença de 63g de tecido adiposo marrom com atividade termogênica na região cervical de indivíduos adultos é capaz de evitar o acúmulo de quatro quilos de gordura ao final de um ano. Logo, o entendimento das vias envolvidas no estímulo termogênico e a descoberta de fármacos e nutracêuticos que ativem a termogênese adaptativa são pertinentes para o controle da obesidade e de comorbidades como o diabetes tipo 2, DHGNA e doenças cardiovasculares.

Utilizando-se dois diferentes modelos dietéticos que produzem anormalidades metabólicas (dieta hiperlipídica e dieta rica em frutose), propõe-se avaliar os efeitos de um tratamento isolado com o capsaicina e agonista do PPAR-alfa, bem como da associação dos dois no eixo intestino-fígado e no tecido adiposo marrom dos animais, com ênfase nos efeitos da modificação da microbiota intestinal sobre o metabolismo energético hepático e na termogênese adaptativa nos adipócitos marrons.

## 5. OBJETIVOS (na íntegra)

Estudar os efeitos da ativação do PPAR-alfa e da suplementação com capsaicina (isolados ou em associação) sobre a resistência à insulina, termogênese no tecido adiposo marrom, metabolismo energético hepático e eixo intestino-fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou rica em frutose.

## 6. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A ativação farmacológica da isoforma alfa (PPAR-alfa) promove redução da massa corporal, alívio da resistência à insulina, formação de adipócitos beges, aumento da termogênese adaptativa, além de redução expressiva da DHGNA pelo aumento da beta-oxidação mitocondrial. Recentemente, a deleção do PPAR-alfa promoveu disbiose intestinal e inflamação do intestino grosso em camundongos. Contudo, não há relatos na literatura se o tratamento com agonista do PPAR-alfa melhora a disbiose em animais alimentados com dietas ricas em frutose ou gordura saturada e nem se a melhora do metabolismo energético hepático promovido pela ativação do PPAR-alfa tem relação com uma possível redução da endotoxemia e preservação da integridade da barreira intestinal.

Já a Capsaicina, um composto fenólico que é responsável pelo sabor pungente ou picante das

pimentas do gênero *Capsicum*, aumenta o gasto energético e contribui para a melhora da resistência à insulina por reduzir a deposição de gordura visceral. É uma substância capaz de regular o metabolismo de lipídios, os hormônios gastrointestinais e inibir as citocinas pró-inflamatórias. Como já foi descrito, a ingestão de capsaicina tem efeito antiobesogênico em camundongos e, além disso, reduz a razão *Firmicutes* / *Bacteroidetes*. Embora os seus mecanismos ainda não sejam bem esclarecidos, a capsaicina apresenta propriedades antiinflamatória, termogênica, antioxidante e antiobesogênica, o que favorece o controle das comorbidades hepáticas da obesidade. Não há relatos na literatura sobre a associação desses dois tratamentos (capsaicina e agonista PPAR-alfa) sobre o eixo intestino-fígado ou sobre o aumento do gasto energético por estímulo à termogênese adaptativa em modelos experimentais alimentados com dieta rica em gordura saturada ou frutose, ressaltando a originalidade e a relevância do presente projeto.

## 7. RESUMO DOS PROCEDIMENTOS COM ANIMAIS

Relatar somente os procedimentos realizados com os animais.

**Animais e Dieta:** Camundongos C57BL/6 machos serão mantidos em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $60 \pm 10\%$ ), com livre acesso à água e dieta, em caixas patogen-free. O ambiente será submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro e de renovação de ar (15 min./h). Todos os procedimentos serão realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (publicação Nº. 85-23 do NIH, revisada em 1996). O protocolo de experimentação será submetido ao Comitê de Ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG).

**Protocolo Experimental:** Camundongos C57BL/6 com 3 meses de idade serão alimentados com dieta hiperlipídica (high-fat, HF, 50% da energia advinda de lipídios,  $n=40$ ) ou rica em frutose (high-frutose, HFRU, 50% da energia advinda da frutose,  $n=40$ ) por um período de dez semanas. Durante o mesmo período o grupo controle receberá dieta padrão para roedores (controle, C,  $n=10$ ). Ambas as dietas seguirão os padrões recomendados pela AIN-93M para roedores (21). Após o período de indução os grupos HF e HFRU serão subdivididos, conforme indicado ( $n=10$  cada grupo): **a) grupo C** (dieta C ao longo do experimento); **b) grupo HF** (dieta HF ao longo do experimento); **c) grupo HFRU** (dieta HFRU ao longo do experimento); **d) grupo HF-A** (dieta HF + agonista PPAR-alfa); **e) grupo HFRU-A** (dieta HFRU + PPAR-alfa); **f) grupo HF-C** (dieta HF + Capsaicina); **g) grupo HFRU-C** (dieta HFRU + Capsaicina); **h) grupo HF-AC** (dieta HF + Capsaicina e agonista PPARalfa); **i) grupo HFRU-AC** (dieta HFRU + Capsaicina e agonista PPARalfa);

O tratamento com o agonista PPARalfa WY14643 (Sigma/Merck, Alemanha, 3mg/Kg/MC) e/ou Capsaicina (Sigma/Merck, Alemanha, 0.02mg/Kg MC) ocorrerá por seis semanas. Os fármacos serão adicionados à dieta (PragSoluções, Jau, São Paulo, Brasil) e o protocolo experimental será realizado no período total de 16 semanas. Amostras de fezes frescas dos animais serão coletadas em gaiola metabólica em três momentos (semana 10 – antes do tratamento-, semana 13 – metade do tratamento, e semana 16 – final do tratamento) para a avaliação da composição da microbiota intestinal ao longo do experimento.

**Análise Metabólica:** Ao final do experimento, uma semana antes do sacrifício, será realizado o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG), no qual a glicemia será mensurada com glicômetro manual (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil) em jejum (tempo 0) e após gavagem orogástrica de solução glicosada nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos.

**Calorimetria Indireta e termografia:** Na penúltima semana de tratamento, os animais de todos os grupos serão colocados em gaiolas metabólicas ligadas em um sistema de módulos de calorimetria (Oxylet System, Panlab Havard Apparatus) durante três dias com livre acesso à comida e à água. Este sistema é programado para monitorar simultânea e continuamente o consumo de  $\text{O}_2$ , a produção de  $\text{CO}_2$  e a taxa de troca respiratória. Os dados são coletados a cada 3 minutos durante 72 horas, com as primeiras 24 horas consideradas um período de climatização. O consumo de oxigênio será calculado por grama de peso corporal metabólico (PC)<sup>0,75</sup>. A temperatura dos animais será documentada com câmera termográfica FLIR C2 (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, EUA) ao final

do tratamento.

**Eutanásia, análises bioquímicas e ELISA:** Os camundongos serão mantidos em jejum por 6 horas e, após anestesia profunda com ketamina e xilazina, o sangue será coletado por punção cardíaca para posteriores dosagens de triglicerídeos, colesterol total, TGO, TGP e gama-GT utilizando analisador semiautomático de bioquímica (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil) e ELISA – insulina (Kit EZRMI-13K, Millipore, MO, EUA) e LPS (Kit MBS452438, MyBioSource, San Diego, CA, EUA). O fígado, o tecido adiposo marrom da região interescapular e o intestino grosso serão cuidadosamente dissecados, pesados e seguirão protocolos para processamento para microscopia de luz e microscopia eletrônica, além de congelados (-80°C) para análises de atividade enzimática antioxidante, *Western blot* e RT-PCR.

**Microscopia de luz e estereologia hepática:** Fragmentos do fígado serão fixados em formalina de Millionig e posteriormente desidratados, diafanizados e incluídos em paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), cortados (5 µm) e corados com hematoxilina e eosina. Fotomicrografias digitais do tecido hepático serão obtidas para estimar a densidade de volume (Vv) de esteatose (%) pela técnica de contagem de pontos, utilizando um sistema teste definido pelo STEPAnizer (22).

**Imunohistoquímica:** Lâminas histológicas de intestino grosso serão incubadas com anticorpo anti-GLP2 (ab48590, Abcam, Cambridge, Reino Unido) ou anti-occludina (ab167161, Abcam, Cambridge, Reino Unido). a fim de verificar o efeito das dietas e dos tratamentos propostos sobre a integridade da barreira intestinal e das zônulas de oclusão presentes entre os colonócitos.

**Microscopia Confocal:** Para imunofluorescência, secções desparafinizadas e hidratadas de tecido adiposo marrom interescapular (5 µm) serão tratadas com tampão citrato (pH 6.0, a 60° C por 20 min) para recuperação antigênica e, então, com glicina 2% e tampão de bloqueio (PBS/5%BSA). As secções serão incubadas overnight a 4°C com o anticorpo UCP-1 na diluição 1:50 em PBS/1%BSA e, em seguida, serão incubadas por 1h, em temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo, na diluição 1:50 em PBS/1%BSA. As lâminas, então, serão lavadas com PBS e montadas com Slow Fade Antifade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Imagens digitais imunofluorescentes serão obtidas utilizando-se microscopia confocal (Nikon Confocal Laser Scanning Microscopy – Model C2; Nikon Instruments, Inc., New York, EUA).

**Microscopia Eletrônica de Transmissão:** Fragmentos do fígado e do intestino (1 mm<sup>3</sup>) serão fixados com 2,5% de glutaraldeído em 0,1 mol de tampão cacodilato, pH 7,4, pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% em 0.1 mol de tampão cacodilato a 4°C, desidratados em uma série de soluções de acetona de concentração crescente e incluídas em resina epóxi (EPON 812). Seções ultrafinas (prateadas) serão cortadas em um ultramicrotomo (Leica Ultracut ultramicrotome), contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas ao microscópio eletrônico JEOL / JEM – 1200 EX (CENABIO, UFRJ). A observação da ultraestrutura hepática terá o objetivo de verificar o padrão de gotículas lipídicas (macro ou microesteatose), o remodelamento mitocondrial e do retículo endoplasmático frente às dietas e os tratamentos propostos. Já no intestino, a observação será direcionada à integridade da barreira intestinal após os tratamentos propostos, com ênfase na observação das zônulas de oclusão.

**Atividade antioxidante hepática:** A atividade das enzimas antioxidantes hepáticas catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e manganês superóxido dismutase (MnSOD) serão determinadas em homogenato do fígado ao final do experimento como previamente descrito (23).

**RT-qPCR:** Fragmentos do fígado e de tecido adiposo marrom serão transferidos para microtubos autoclavados contendo solução de lise para extrair e isolar o RNAm. Este será quantificado utilizando contador espectrofotômetro. O cDNA será sintetizado a partir do RNAm das amostras. Para amplificação do cDNA, o mesmo será misturado com o primer do gene de interesse e Power SYBR PCR Master Mix. As condições da reação de amplificação dependerão do gene em questão a ser amplificado. A beta actina será utilizada como gene constitutivo para corrigir a expressão dos genes de interesse (genes que transcrevem as proteínas que serão analisadas por western blotting para o fígado e para o tecido adiposo marrom). Além disso, o DNA genômico bacteriano será extraído das amostras de fezes congeladas obtidas na semana 10, 13 e 16 com a utilização de DNazol seguindo

especificações do fabricante (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA). Primers específicos serão desenhados para o RNA ribossomal 16S dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Cada poço de análise será composto por 5µL de Power SYBR PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 100 nM do primer específico para o filo de interesse e 1 µL de DNA (24). As condições de amplificação dependerão de cada gene a ser amplificado.

**Western Blot:** Fragmentos de fígado, tecido adiposo marrom e do intestino grosso serão adicionados ao tampão de extração de proteínas, com inibidor de protease e fosfatase, para quantificação da concentração proteica (Pierce BCA ProteinAssay Kit, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA). Será realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida e a transferência do gel para a membrana por eletrotransferência. A membrana será incubada com anticorpo primário *overnight* a 4°C para as proteínas de interesse:

Intestino grosso: GLP-2 (regulador da expressão de proteínas estruturais das zônulas de oclusão) e occludina (proteína estrutural das zônulas de oclusão).

Fígado: XBP-1, TRAF2, ERK, JNK, MnSOD, GPx, GRS e catalase (marcadores de estresse oxidativo e do estresse do retículo endoplasmático); PPAR-alfa, CPT-1a, PPAR-gama, FAZ, SREBP1c, chREBP, glicose-6-fosfatase e GLUT-2 (direcionados à avaliação do metabolismo energético hepático); TLR4 (*Toll Like* receptor 4), NFκB (Fator nuclear kappa B) e TNF-α (fatores relacionados à inflamação e morte celular).

Tecido adiposo marrom: UCP-1, PPAR-α, PGC1-α, PRDM16, RAβ-3, BMP8, NRF-1 e TFAM (fatores envolvidos na via termogênica e na biogênese mitocondrial).

No dia seguinte, a membrana será incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A reação será visualizada por incubação com ECL e detectada por quimioluminescência em câmera digital acoplada ao sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

**Análise estatística dos dados:** Os dados serão testados quanto à normalidade da distribuição e homocedasticidade das variâncias e analisados por ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak. Em todos os casos utilizando-se o índice de significância com  $p < 0,05$  (GraphPadPrism, versão 6, CA, EUA). ANOVA de dois fatores será utilizada para verificar possíveis interações entre a dieta e o tratamento proposto sobre os desfechos avaliados.

## 8. MODELO ANIMAL

Espécie e subespécie  
(inclua nome vulgar, se existir):  
Justificar a escolha:

Camundongos da linhagem C57BL/6

Mimetiza o quadro de Síndrome Metabólica de humanos.

Somente para estudos envolvendo a coleta de animais silvestres (com SISBIO já aprovado, copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todas as espécies e subespécies sejam contempladas).

### 8.1. PROCEDÊNCIA, TIPO E CARACTERÍSTICA

Biotério  Fazenda  Outra, qual?

É animal silvestre? Sim  Não

Em caso afirmativo, qual é o número SISBIO?

Em caso afirmativo, qual é o método de captura:

É animal geneticamente modificado? Sim  Não

Em caso afirmativo, qual é o número CTNBio?

É um mutante natural?

Sim

Não

Em caso afirmativo, qual é a mutação?

Para os casos de estudos com tamanho de amostra previamente determinado preencha a tabela abaixo. Para estudos com amostra determinada pelas condições de coleta (animais silvestres), preencher os dados no item 8.1.1.

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	Sexo indeterminado.
Anfíbio						
Ave						
Cão						
Camundongo heterogênico						
Camundongo isogênico	C57BL/6	3 meses	20 gramas	90	0	0
Camundongo <i>Knockout</i>						
Camundongo transgênico						
Chinchila						
Cobaia						
Coelhos						
Espécie silvestre brasileira						
Espécie silvestre não-brasileira						
Gato						
Gerbil						
Hamster						
Ovino						
Peixe						
Rato heterogênico						
Rato isogênico						
Rato <i>Knockout</i>						
Rato transgênico						
Réptil						
Outra (descrever abaixo):						
			<b>TOTAIS:</b>	90	0	0

8.1.1. SOMENTE PARA ANIMAIS SILVESTRES COM AMOSTRA DETERMINADA PELAS CONDIÇÕES DE COLETA INDIQUE:

Espécie e subespécie:

Tamanho amostral mínimo e máximo:

Peso mínimo e máximo de coleta:

Será feita sexagem? Como?


Utilize esta tabela acima para o preenchimento de uma espécie e subespécie. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todas as espécies e subespécies sejam contempladas.

## 8.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO E JUSTIFICATIVA DO TAMANHO DA AMOSTRA

Incluir informações quanto aos grupos previstos e respectivos tamanhos amostrais.

**Delineamento Experimental:** Camundongos C57BL/6 com 3 meses de idade serão alimentados com dieta hiperlipídica (high-fat, HF, 50% da energia advinda de lipídios, n=40) ou rica em frutose (high-frutose, HFRU, 50% da energia advinda da frutose, n=40) por um período de dez semanas. Durante o mesmo período o grupo controle receberá dieta padrão para roedores (controle, C, n=10). Ambas as dietas seguirão os padrões recomendados pela AIN-93M para roedores (21). Após o período de indução os grupos HF e HFRU serão subdivididos, conforme indicado (n=10 cada grupo): **a) grupo C** (dieta C ao longo do experimento); **b) grupo HF** (dieta HF ao longo do experimento); **c) grupo HFRU** (dieta HFRU ao longo do experimento); **d) grupo HF-A** (dieta HF + agonista PPAR-alfa); **e) grupo HFRU-A** (dieta HFRU + PPAR-alfa); **f) grupo HF-C** (dieta HF + Capsaicina); **g) grupo HFRU-C** (dieta HFRU + Capsaicina); **h) grupo HF-AC** (dieta HF + Capsaicina e agonista PPARalfa); **i) grupo HFRU-AC** (dieta HFRU + Capsaicina e agonista PPARalfa);

O tratamento com o agonista PPARalfa WY14643 (Sigma/Merck, Alemanha, 3mg/Kg/MC) e/ou Capsaicina (Sigma/Merck, Alemanha, 0.02mg/Kg MC) ocorrerá por seis semanas. Os fármacos serão adicionados à dieta (PragSoluções, Jau, São Paulo, Brasil) e o protocolo experimental será realizado no período total de 16 semanas. Amostras de fezes frescas dos animais serão coletadas em gaiola metabólica em três momentos (semana 10 – antes do tratamento-, semana 13 – metade do tratamento, e semana 16 – final do tratamento) para a avaliação da composição da microbiota intestinal ao longo do experimento.

**Planejamento estatístico:** Os dados serão testados quanto à normalidade da distribuição e homocedasticidade das variâncias e serão avaliados por ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak. Em todos os casos o índice de significância com  $p < 0,05$  será adotado (GraphPadPrism, versão 6, CA, EUA).

**Justificativa do tamanho da amostra:** O tamanho das amostras foi estabelecido levando em consideração a probabilidade  $p = 1/2$  de ocorrer aumento ou diminuição das variáveis de interesse. Dessa forma, considerando o nível de significância  $p = 0,05$ , o número mínimo significativo de animais utilizados na análise estatística será:  $p = (1/2)$  eventos; portanto, se  $n = 5$ ,  $p = (1/2)^5$  ou  $p = 0,03$ ; então,  $p < 0,05$  (Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. Am J Physiol. 1990; PMID: 2185653). Logo, cada grupo de nosso experimento terá o  $n=10$ , uma vez que cinco animais serão utilizados para a realização do PCR e western blotting e outros cinco serão destinados às técnicas de microscopia de luz e eletrônica, as quais seguem protocolos de processamento e conservação diferentes.

### 8.3. CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS

Alimentação, fonte de água, lotação (número de animais/área), exaustão do ar. Comentar obrigatoriamente sobre estes itens e as demais condições que forem particulares à espécie.

Os animais serão mantidos em ambiente apropriado com temperatura controlada ( $21 \pm 2$  °C), e umidade ( $60 \pm 10\%$ ), submetidos a ciclo de 12h claro-escuro. Serão alojados em grupos de cinco em estantes ventiladas específicas para camundongos, com livre acesso à água e à comida em bebedouros e comedouros acoplados as suas respectivas caixas.

**Local onde será mantido o animal durante o período experimental:**

Biotério  Outro, qual?

Em caso de biotério, preencha as seguintes informações:

Está registrado no CIUCA / CONCEA? Sim  Não

Em caso afirmativo, indique:

• Localização:	Instituição	UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
	Unidade	INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES
	Departamento	Anatomia
	Endereço completo (incluindo pavilhão e bloco, quando pertinente)	Pavilhão Américo Piquet Carneiro (PAPC) Boulevard 28 de Setembro, 87 – CEP 20551-030 Tel.: (21) 2868-8388
• Docente responsável:	Nome	Sandra Barbosa da Silva
	Telefone	(21) 2868-8316
	e-mail	<a href="mailto:sandrabarbosasilva@gmail.com">sandrabarbosasilva@gmail.com</a>
• Médico veterinário: (responsável técnico)	Nome	Sylvio Claudio Neto
	CRMV	10009
	Telefone	(21) 2868-8029
	e-mail	<a href="mailto:sylvioclaudio@gmail.com">sylvioclaudio@gmail.com</a>

**Ambiente de alojamento durante o período experimental:**

Gaiola  Jaula  Baia  Outro, qual?

Número de animais por unidade de habitação (gaiola / jaula / aquário)

Tipo de cama (maravalha, estrado ou outro):

## 9. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO PROJETO

### 9.1. GRAU DE INVASIVIDADE:

**Grau:**      **Descrição:**

- GI1  **Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse.**  
Ex.: observação e exame físico; administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular de substâncias que não causem reações adversas perceptíveis; eutanásia por métodos aprovados após anestesia ou sedação; privação alimentar ou hídrica por períodos equivalentes à privação na natureza.
- GI2  **Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade.**  
Ex.: procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves.
- GI3  **Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária.**  
Ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardíaca e intracerebral.
- GI4  **Experimentos que causam dor de alta intensidade.**  
Ex.: Indução de trauma a animais não sedados.  
**ATENÇÃO:** Para os projetos envolvendo o grau de invasividade 4 (GI4), o protocolo somente poderá ser aprovado após entrevista do pesquisador responsável pelos membros da CEUA-UERJ, em data a ser combinada após a avaliação inicial do formulário.

### 9.2. ESTRESSE E/OU DOR INTENCIONAL NOS ANIMAIS

Sim  Não

Em caso afirmativo, indique:

<b>Período</b>		<b>Tipo</b>	
Curto	<input checked="" type="checkbox"/>	Estresse	<input checked="" type="checkbox"/>
Longo	<input type="checkbox"/>	Dor	<input type="checkbox"/>
		Restrição líquida ou alimentar	<input checked="" type="checkbox"/>
		Outros	<input type="checkbox"/>

Justifique os itens aplicáveis:

Gavagem orogástrica de glicose no procedimento do Teste Oral de Tolerância à Glicose, jejum de seis horas e gaiola metabólica para a realização da calorimetria indireta e da coleta de fezes.

### 9.3. CONDIÇÕES ALIMENTARES E DE HIDRATAÇÃO

Os animais serão submetidos a jejum?

Sim  Não  Caso afirmativo, por quanto tempo?

Seis horas (para a realização de exame).

Os animais serão submetidos à restrição líquida?

Sim  Não  Caso afirmativo, por quanto tempo?

### 9.4. IMOBILIZAÇÃO DO ANIMAL

Sim  Não

Em caso afirmativo indique a razão, o tipo e o tempo de imobilização:

Na gavagem orogástrica de glicose, região cervical apenas para permitir o procedimento, por um curto período de tempo.

### 9.5. EXPOSIÇÃO / INOCULAÇÃO / ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIA(S)

Incluindo tóxicas e radioativas e excluindo anestésicos, analgésicos e relaxantes musculares indicados anteriormente.

Sim  Não

Substância	Agonista do PPAR-alfa (WY14643)
Dose (UI ou mg/kg)	3mg/Kg de massa corporal
Via de administração	Adicionado à dieta
Frequência	Consumo diário ao longo do período de tratamento
Duração	Seis semanas

Substância	Caposaicina
Dose (UI ou mg/kg)	0.02mg/Kg de massa corporal
Via de administração	Adicionado à dieta
Frequência	Consumo diário ao longo do período de tratamento
Duração	Seis semanas

Substância	Glicose
Dose (UI ou mg/kg)	1g/Kg de massa corporal
Via de administração	Orogástrica
Frequência	1 vez
Duração	15 segundos (gavagem)

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de uma substância. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todas as substâncias sejam contempladas.

### 9.6. EXPOSIÇÃO E/OU INOCULAÇÃO DE MICROORGANISMOS E PARASITAS

Incluindo vírus, fungos e bactérias.

Sim  Não

Espécie	
Quantidade/dose	
Via de administração	
Frequência	
Duração	

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de uma espécie. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todas as espécies sejam contempladas.

Haverá dor continuada associada à sobrevida após a exposição?

Sim  Não

Em caso afirmativo indique os procedimentos que serão utilizados: 1) para monitorar os animais após a infecção; 2) para controlar a dor.

### 9.7. CIRURGIA

Sim  Não

Em caso afirmativo, indique se será realizada apenas uma cirurgia ou se serão múltiplas cirurgias:

Única  Múltiplas

Em caso de múltiplas cirurgias, indique se estas serão realizadas no mesmo ato ou em diferentes atos cirúrgicos:

Mesmo  Diferentes

Em que parte(s) do corpo do animal será(ão) realizada(s) a(s) intervenção(ões)?

A manipulação cirúrgica resultará em sobrevida?

Sim  Não

Onde será realizada a cirurgia?

Centro cirúrgico  Laboratório  Biotério  Outro

Haverá observação da recuperação pós-operatória?

Sim  Não

Em caso afirmativo, por quanto tempo? Em caso negativo, justifique:

Haverá uso de analgesia no pós-operatório?

Sim  Não

Em caso negativo, justifique:

### 9.8. USO DE FÁRMACOS ANESTÉSICOS

Sim  Não

Em caso negativo, justifique:

Os anestésicos serão utilizados na finalização dos animais, conforme descrito no item 11 deste protocolo.

Em caso afirmativo, no campo "fármaco", no presente item e nos próximos (relaxante muscular e analgésicos), deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista\\_dcb\\_2007.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf)

Fármaco	Ketamina
Dose (UI ou mg/kg)	240 mg/Kg
Via de administração	Intraperitoneal

Fármaco	Xilazina
Dose (UI ou mg/kg)	30 mg/Kg
Via de administração	Intraperitoneal

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

Como será avaliado o nível de anestesia?

Pressão arterial	<input type="checkbox"/>	Reflexo corneano	<input type="checkbox"/>
Frequência respiratória	<input type="checkbox"/>	Reflexo flexor	<input type="checkbox"/>
Frequência cardíaca	<input type="checkbox"/>	Reflexo da cauda	<input checked="" type="checkbox"/>
EEG	<input type="checkbox"/>	Outros	<input type="checkbox"/>

Em caso de outros, especifique:

### 9.9. USO DE RELAXANTE MUSCULAR

Sim  Não

Fármaco	
Dose (UI ou mg/kg)	
Via de administração	

Utilize esta tabela acima para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

### 9.10. USO DE FÁRMACOS ANALGÉSICOS

Sim  Não

Em caso negativo, justifique:

Os procedimentos utilizados não produzem dor que justifique o uso de analgésicos.

Fármaco

Dose (UI ou mg/kg)  
Via de administração


Utilize esta tabela acima para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

## 10. EXTRAÇÃO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Sim  Não

Material biológico	Intestino grosso (ceco)
Quantidade	100 mg
Frequência	1 vez
Método de coleta	Dissecção da porção inicial do intestino grosso na eutanásia.

Material biológico	Fígado
Quantidade	600 mg
Frequência	1 vez
Método de coleta	Dissecção do fígado na eutanásia.

Material biológico	Tecido adiposo marrom
Quantidade	100 mg
Frequência	1 vez
Método de coleta	Dissecção do tecido adiposo marrom interescapular na eutanásia.

Material biológico	Sangue
Quantidade	500 µL
Frequência	1 vez
Método de coleta	Punção cardíaca pelo átrio direito na eutanásia.

Material biológico	Fezes
Quantidade	50 mg
Frequência	3 vezes
Método de coleta	Coleta em gaiola metabólica nas semanas 10, 13 e 16 de experimento.

Utilize esta tabela para o preenchimento de um material biológico. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os materiais sejam contemplados.

Os materiais biológicos destes exemplares serão usados em outros projetos?

Sim  Não

Quais? Se já aprovado pela CEUA, mencionar o número do protocolo.

--

## 11. FINALIZAÇÃO

### 11.1. MÉTODO DE INDUÇÃO DE MORTE

A morte dos animais será induzida como parte do protocolo experimental?

Sim  Não

Em caso afirmativo:

Descrição	Dose letal de anestésico
Substância, dose, via	Ketamina (240 mg/Kg) e Xilazina (30 mg/Kg), via intraperitoneal.

Caso método restrito, justifique:

--

## 11.2. FORMA DE DESCARTE DA CARÇAÇA

Recolhimento e incineração por empresa especializada contratada pelo HUPE/UERJ para tal fim.
--

## 11.3. DESTINO DOS ANIMAIS APÓS O EXPERIMENTO CASO NÃO HAJA INDUÇÃO DA MORTE

--

## 12. TERMO DE RESPONSABILIDADE (Leia cuidadosamente antes de assinar)

Eu, Vanessa de Souza Mello (nome do responsável), certifico que:

- li o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.
- irei submeter à apreciação prévia da CEUA-UERJ toda e qualquer modificação que venha a ser necessária à realização do presente projeto (incluindo a inclusão ou exclusão de colaboradores) antes de implementar tal modificação, o que só poderá ser feito após a aprovação formal e por escrito desta pela CEUA-UERJ.
- estou ciente de que os membros da CEUA-UERJ podem fiscalizar os procedimentos experimentais aqui indicados e os ambientes onde os animais são alojados ou submetidos aos referidos procedimentos sem aviso ou autorização prévia por parte do pesquisador responsável ou de seus colaboradores.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## ENCAMINHAR EM 2 VIAS.

A critério da CEUA, esta poderá solicitar o projeto, respeitando confidencialidade e conflito de interesses.

Quando cabível, anexar o termo de consentimento livre e esclarecido do proprietário ou responsável pelo animal.

## 13. RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no uso de animais, na sua reunião de \_\_31\_\_ / \_\_07\_\_ / \_\_2018\_\_ ,  
APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ