



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**A MICROBIOTA INTESTINAL DE DOENTES JOVENS
COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 1: UMA
ABORDAGEM PROTEÓMICA E METABOLÓMICA**

Adélia Cristina Bravo Brito de Abreu Ova

Mestrado em Ciências Biomédicas

2013



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**A MICROBIOTA INTESTINAL DE DOENTES JOVENS
COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 1: UMA
ABORDAGEM PROTEÓMICA E METABOLÓMICA**

Dissertação orientada por Professora Doutora Maria Leonor Faleiro

Adélia Cristina Bravo Brito de Abreu Ova
n.º 30597

Mestrado em Ciências Biomédicas
2013

*“Ainda que os teus passos pareçam inúteis, vão abrindo caminhos, como a água
que desce cantando da montanha. Outros te seguirão...”*

Antoine Saint-Exupéry

“A microbiota intestinal de doentes jovens com Diabetes *mellitus* tipo 1: uma abordagem proteómica e metabolómica”

Declaração de Autoria do Trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Adélia Cristina Bravo Brito de Abreu Ova

Copyright, Adélia Cristina Bravo Brito de Abreu Ova

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à professora Leonor Faleiro, por ter aceite ser minha orientadora na dissertação de mestrado, e pela paciência, compreensão, ajuda e incentivo que me deu na elaboração da tese e do trabalho laboratorial.

À doutoranda Elsa Pinto Rodrigues pelo apoio, amizade e paciência em me ensinar todas as técnicas e protocolos laboratoriais necessários à realização do meu trabalho, e pela grande ajuda no trabalho de proteómica e no tratamento dos dados referentes à metabolómica, muito obrigada!

À Joana Duarte e Ana Silvério, minhas colegas de laboratório e também mestrandas da professora Leonor, obrigada pelo apoio, incentivo e amizade.

Gostaria também de agradecer à técnica Liseta Viegas, pela sua ajuda e paciência em nos explicar (a mim e às minhas colegas) tudo o que era relativo ao funcionamento do laboratório e pela amizade demonstrada.

À minha família pelo apoio, carinho, paciência e compreensão ao longo destes últimos meses. Um agradecimento muito especial para a minha irmã, que nos momentos mais complicados e atribulados, me fez ver que tudo tem solução e que muitas vezes o impossível só existe na nossa mente!

Quero agradecer também aos meus amigos Joana Cristo, Denise Schrama, João Pinto da Costa e Jessie Melo pelo incentivo e amizade demonstrada, às vezes em alturas muito complicadas. E gostaria de agradecer em especial ao Fábio Paiva pela paciência, carinho e amizade que teve para comigo, durante todo o processo de elaboração da tese.

E por último quero agradecer a todos aqueles que de algum modo participaram neste processo.

Muito Obrigada!

Resumo

O trato gastrointestinal do ser humano é colonizado por vários microrganismos; bactérias, arqueobactérias, fungos e vírus. As alterações, quer na composição da microbiota quer na sua funcionalidade provocam um desequilíbrio designado por disbiose. Em situações de doenças crónicas e permanentes como é o caso da diabetes *mellitus* tipo 1, o conhecimento que se possui sobre a composição e funcionalidade da microbiota intestinal é ainda muito limitado. Neste estudo pretendeu-se analisar a funcionalidade da microbiota intestinal de jovens adultos diabéticos, através da análise do seu proteoma e metaboloma.

A análise do proteoma da microbiota intestinal de jovens adultos diabéticos revelou a produção de algumas proteínas apenas pelos indivíduos diabéticos. As proteínas identificadas estão associadas à produção de ácidos gordos, metabolismo e transporte de aminoácidos e metabolismo de hidratos de carbono. Foram ainda encontradas quatro proteínas sem função atribuída.

No perfil metabolómico da microbiota intestinal de jovens adultos diabéticos identificou-se vários metabolitos pertencentes a diferentes grupos funcionais, mas o grupo em que se identificou um maior número de metabolitos, foi nos ácidos gordos de cadeia curta. Não se encontraram diferenças significativas entre a quantidade dos metabolitos produzida pelos grupos em estudo, no entanto no grupo dos indivíduos diabéticos foi registada uma variação significativa ($P < 0,05$).

Considerando os resultados da análise do proteoma e do perfil metabolómico dos jovens adultos diabéticos é possível considerar uma alteração na funcionalidade da microbiota intestinal dos indivíduos diabéticos.

Palavras – chave

Microbiota intestinal, Disbiose, Diabetes *mellitus* tipo 1, Proteómica, Metabolómica.

Abstract

The human gastrointestinal tract is colonized by various microorganisms; bacteria, archaea, fungi and viruses. Changes in the composition of the microbiota and in its functionality creates an imbalance called dysbiosis. In situations of chronic and permanent disease, as diabetes *mellitus* type 1 the knowledge of the composition and the functionality of the intestinal microbiota is still very limited. In this study the functionality of the intestinal microbiota of young adults with diabetes, was investigated by analysing its proteome and metabolome.

The analysis of the proteome of the intestinal microbiota of young adults with diabetes revealed the production of some proteins only expressed by diabetic patients. The identified proteins are associated to the production of fatty acid, amino acid transport and metabolism, and carbohydrate metabolism. Were still found four proteins without assigned function.

In the metabolomic profile of the intestinal microbiota of young adults with diabetes, several metabolites were identified as belonging to different functional groups, but the group in which a larger number of metabolites were identified, belong to the short chain fatty acids. No significant differences were found between the amount of metabolites produced by the tested groups, however in the diabetes group a significant variation was observed ($P < 0.05$).

Considering the results of the proteomic and metabolomic analysis of young adults with diabetes is possible to consider a change in functionality of the intestinal microbiota of diabetics individuals.

Key words

Intestinal microbiota, Dysbiosis, Diabetes *mellitus* type 1, Proteomics, Metabolomics.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Palavras – chave	ii
Abstract.....	iii
Key words	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas.....	vi
Capítulo 1 – Introdução Teórica.....	1
1.1 – Diabetes <i>mellitus</i>	1
1.1.1 – Contexto histórico sobre a Diabetes	1
1.1.2 – Definição, Causas e Consequências da Diabetes.....	2
1.1.3 – Critérios de Diagnóstico e Tipos de Diabetes	3
1.1.4 – Fatores Epidemiológicos da Diabetes <i>mellitus</i> em Portugal e no Mundo.....	8
1.2 – Microbiota intestinal e a Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	10
1.2.1 – Composição microbiana do trato gastrointestinal (TGI).....	10
1.2.2 – Funções da microbiota no trato gastrointestinal (TGI).....	12
1.2.3 – Microbiota intestinal e o seu papel na saúde e na doença.....	13
1.2.4 – Interação entre a microbiota intestinal e o sistema imune	14
1.2.5 – Como a microbiota e o sistema imune influenciam o aparecimento de diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.....	15
1.3 – A análise Proteómica da microbiota.....	18
1.3.1 – Princípios Teóricos	18
1.3.2 – Análise Proteómica aplicada ao estudo da Diabetes.....	20
1.4 – O metaboloma	21
1.4.1 – Princípios Teóricos	21
1.4.2 – Análise Metabólica aplicada ao estudo da Diabetes.....	23
1.5 – Objetivos.....	24
Capítulo 2 – Material e Métodos.....	25
2.1 – Material.....	25
2.1.1 – Equipamentos	25
2.1.2 – Soluções	26

2.1.3 – Material Biológico	27
2.2 – Métodos	27
2.2.1 – Optimização do protocolo de extracção proteica da microbiota intestinal	27
2.2.2 – Extração das proteínas da microbiota intestinal	28
2.2.3 - Quantificação das proteínas pelo método de Bradford.....	29
2.2.4 – Extração do DNA da microbiota intestinal	29
2.2.5 – Electroforese Bi-Dimensional (2-DE)	29
2.2.5.1 – Preparação da amostra proteica, rehidratação das tiras e focagem isoelectrica .	30
2.2.5.2 – Equilibração das tiras	32
2.2.6 – Preparação dos géis de poliacrilamida.....	33
2.2.7 – Coloração com Nitrato de Prata.....	34
2.2.8 - Digitalização e análise dos géis.....	35
2.2.9 – Identificação das proteínas	36
2.2.10 – Extração de Metabolitos de amostras fecais.....	36
2.2.11 – Medição do pH e do teor de água fecal.....	37
2.2.12 – Contagem bacteriana total por qPCR em tempo real.....	37
2.2.13 – Inquérito realizado aos jovens adultos saudáveis e diabéticos.....	38
Capítulo 3 – Resultados.....	39
3.1 – Análise dos hábitos alimentares.....	39
3.2 – Contagem bacteriana total	40
3.3 – O proteoma da microbiota intestinal	40
3.4 – Análise metabolómica da microbiota intestinal.....	44
3.4.1 – pH e teor de água das amostras analisadas por NMR.....	44
3.4.2 – Perfil metabolómico de cada indivíduo	45
Capítulo 4 – Discussão	52
4.1 – O proteoma da microbiota intestinal	52
4.2 – Análise metabolómica da microbiota intestinal.....	61
Capítulo 5 – Considerações finais e Perspetivas Futuras	62
5.1 – Considerações finais.....	62
5.2 – Perspetivas Futuras.....	63
Capítulo 6 – Bibliografia	64
Capítulo 7 – Anexos	71

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Símbolo das Nações Unidas para a Diabetes *mellitus*

Figura 1.2 – Desenho esquemático da diabetes *mellitus* tipo 2

Figura 1.3 – Desenho esquemático da diabetes *mellitus* gestacional

Figura 1.4 – Desenho esquemático da diabetes *mellitus* tipo 1

Figura 1.5 – Prevalência da diabetes em Portugal por sexo em 2011

Figura 1.6 – Características da microbiota do trato gastrointestinal

Figura 1.7 – Aspetos temporais do estabelecimento e manutenção da microbiota e os fatores que influenciam a composição microbiana

Figura 1.8 – As vias nas quais a expressão do gene e da proteína podem ser reguladas ou modificadas desde a transcrição até após a tradução

Figura 3.1 – Perfil proteico da microbiota intestinal dos indivíduos diabéticos (A) e saudáveis (B)

Figura 3.2 – Perfil metabólico da microbiota intestinal dos indivíduos diabéticos (A, B, C e D) e saudáveis (E, F, G e H)

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Critérios para o diagnóstico de diabetes *mellitus*

Tabela 1.2 – Incidência da diabetes em Portugal

Tabela 1.3 - Prevalência da diabetes tipo 1 nas Crianças e nos Jovens em Portugal

Tabela 1.4 – Incidência da diabetes tipo 1

Tabela 2.1 – Composição do gel a 12,5%

Tabela 2.2 – Condições de corrida dos géis 2-DE

Tabela 2.3 – Primer e sonda utilizados no qPCR em tempo real para quantificação do Total Count

Tabela 3.1 – Identificação dos pontos proteicos da microbiota intestinal de jovens adultos diabéticos e de jovens saudáveis

Tabela 3.2 – Valores de pH e teor de água das amostras fecais analisadas

Tabela 3.3 – Metabolitos presentes nas fezes de quatro indivíduos saudáveis (S) e quatro indivíduos diabéticos (D)

Capítulo 1 – Introdução Teórica

1.1 – Diabetes *mellitus*

1.1.1 – Contexto histórico sobre a Diabetes

A descrição mais antiga da diabetes foi encontrada num manuscrito egípcio, o *Papiro de Ebers*, em 1500 aC, onde fazem referência a “uma grande perda de urina” (Ripoll, 2011).

Em 276 aC na Grécia pela primeira vez, *Demetrius de Apameia* utilizou o termo “diabetes”, que significa “sifão”, mas só em 230 aC, o grego *Appolonius de Memphis* forneceu uma descrição mais pormenorizada dos sintomas (Savona-Ventura, 2009).

A primeira descrição clínica completa da diabetes foi feita por um médico grego, *Aretaeus da Capadócia* no século II dC (Savona-Ventura, 2009), que observou uma excessiva quantidade de urina que passava através dos rins e deu à enfermidade o nome de “diabetes”, sendo que a descrição exacta foi “*A carne do corpo e dos membros derretia-se e convertia-se em urina*” (Dallas, 2011).

Sushruta e *Charaka*, médicos indianos, em 400 a 500 dC, identificaram a doença e classificaram-na como *madhumeha* ou urina-mel, quando observaram que a urina atraía formigas. Identificaram ainda duas condições distintas, diabetes tipo 1 e tipo 2, sendo que o tipo 1 foi definido como estando associado à juventude (aos mais jovens, crianças e adolescentes) e o tipo 2 foi definido como estando associado ao excesso de peso (Poretsky, 2009).

Na Pérsia medieval (980-1037 dC) *Avicenna* forneceu um relato detalhado sobre a diabetes *mellitus* no *The Canon of Medicine*, descrevendo um apetite anormal e o colapso das funções sexuais, fazendo referência ao sabor doce da urina colhida dos doentes. Tal como *Aretaeus* antes dele, *Avicenna* também reconheceu a diabetes primária e secundária, descreveu a gangrena que resulta de feridas mal curadas em indivíduos diabéticos e chegou a formular um tratamento para tratar a diabetes, utilizando para isso uma mistura de tremoço, *Trigonella* (feno grego) e sementes de *Curcuma zedoaria*, que leva a uma redução considerável na excreção de açúcar, sendo um conceito ainda utilizado (Nabipour, 2003).

Johann Peter Frank (1745-1821) foi quem identificou diferenças entre diabetes *mellitus* e diabetes *insipidus* (Nabipour, 2003).

Em 1776, Matthew Dobson confirmou que o sabor doce provém de um tipo de açúcar que se encontra em excesso na urina e sangue (Dobson, 1776).

O termo *mellitus* ou “de mel” foi acrescentado pelo britânico John Rolle no fim do século XVIII, para o diferenciar de uma segunda condição conhecida como diabetes *insipidus*, à qual também está associada uma micção frequente (Poretsky, 2009).

A descoberta do papel que o pâncreas desempenhava na diabetes é geralmente atribuída a Joseph von Mering e Oskar Minkowski, que em 1889 descobriram que cães cujo pâncreas tinha sido removido, desenvolviam todos os sintomas e sinais de diabetes e morriam num curto espaço de tempo (Von Mehring, 1890).

Em 1910, Sir Edward Albert Sharpey-Schafer sugeriu que pessoas com diabetes apresentavam deficiência num único produto químico que, normalmente, era produzido pelo pâncreas. Designou essa substância de insulina, do latim *ínsula*, que significa ilha, e de forma a fazer referência aos ilhéus de Langerhans existentes no pâncreas e produtores de insulina. A distinção do que hoje entendemos como diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2, foi estabelecida por Sir Harold Percival (Harry) Himsworth tendo sido publicada em Janeiro de 1936 (Himsworth, 1936).

1.1.2 – Definição, Causas e Consequências da Diabetes

Segundo a Organização Mundial de Saúde a diabetes *mellitus* (Fig.1.1) é uma doença metabólica crónica que pode surgir quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não consegue utilizar de forma eficaz a insulina que produz. A insulina é uma hormona que tem como função principal regular os níveis de açúcar presentes no sangue. Hiperglicémia, ou nível de açúcar elevado no sangue, é um efeito comum da diabetes descontrolada e ao longo do tempo pode dar origem a várias complicações em diferentes sistemas do corpo, especialmente nervos e vasos sanguíneos (WHO, 2012).



Figura 1.1 – Símbolo das Nações Unidas para a Diabetes *mellitus*
(Fonte: International Diabetes Federation)

Para a diabetes não é possível indicar uma causa em concreto, pois existem várias causas que podem provocar a doença. A doença pode surgir devido a defeitos genéticos, quer no funcionamento das células beta do pâncreas (por exemplo: MODY “*Maturity onset*

diabetes of the young” e mutações no DNA mitocondrial) quer no processamento de insulina ou ação da insulina (por exemplo: mutações do gene responsável pela produção de insulina no receptor da insulina), devido a defeitos do pâncreas exócrino (por exemplo: pancreatite crónica, neoplasia do pâncreas, fibrose cística, entre outros), devido a endocrinopatias (por exemplo: acromegalia, síndrome de Cushing, hipertiroidismo, entre outros), devido a infecções virais por citomegalovírus ou por rubéola congénita, e ainda devido a consumo de drogas, tais como glucocorticóides, interferão alfa, hormonas tiróideas, entre outras.

A diabetes é uma doença que apresenta várias complicações, podendo danificar vasos sanguíneos, coração, olhos, rins e nervos. A diabetes aumenta o risco de doenças cardíacas e de enfartes (miocárdio, cerebral), sendo que 50% de pessoas com diabetes morrem de doenças cardiovasculares, tais como acidente vascular cerebral (AVC). Também devido à redução do fluxo sanguíneo, a neuropatia condiciona o aparecimento de úlceras nos pés que podem dar origem a gangrenas, o que, eventualmente pode levar a amputação do membro, a diabetes é a causa mais frequente de amputações traumáticas dos membros inferiores. A retinopatia diabética é uma importante causa de cegueira e ocorre como resultado de danos acumulados a longo prazo nos pequenos vasos sanguíneos da retina. Verificou-se que, após 15 anos de diabetes, cerca de 2% das pessoas tornam-se cegas e cerca de 10% desenvolvem uma deficiência visual grave. A diabetes *mellitus* é também uma das principais causas de insuficiência renal, sendo que entre 10 a 20% das pessoas que tem diabetes morrem de insuficiência renal. A neuropatia diabética, ou seja danos nos nervos como resultado da diabetes, afecta cerca de 50% das pessoas que padecem desta doença. Os sintomas mais comuns são a sensação de formigueiro, dor, dormência ou fraqueza nos pés e mãos. O risco de morte entre pessoas com diabetes é pelo menos o dobro do risco de pessoas sem diabetes (WHO, 2012).

1.1.3 – Critérios de Diagnóstico e Tipos de Diabetes

Os meios de diagnóstico da diabetes baseiam-se em medições dos níveis de glucose no sangue e na presença ou ausência de sintomas. Os critérios de diagnóstico da diabetes estão descritos na Tabela 1.1, sendo fundamental a evidência de hiperglicemia. (Craig, 2009).

Tabela 1.1 - Critérios para o diagnóstico de diabetes *mellitus* (Adaptado de: Craig, 2009)

Critérios	Descrição
1	Sintomas de diabetes e uma concentração de glucose no plasma casual $\geq 200\text{mg/dl}$; sendo casual qualquer altura do dia
2	Glucose plasmática em jejum $\geq 126\text{mg/dl}$; jejum é definido como nenhuma ingestão calórica em pelo menos 8h
3	2h após a toma de glucose $\geq 200\text{mg/dl}$ durante um OGTT; OGTT é um teste de tolerância oral à glucose, em que é dado a ingerir 75g de glucose anidra dissolvida em água e passadas 2h são medidos os valores de açúcar

A diabetes apresenta-se classicamente por um conjunto de três sintomas: poliúria (ou seja, aumento do volume de urina), polidipsia (ou seja, um aumento na sensação de sede e consequentemente um aumento na ingestão de líquidos) e polifagia (ou seja, um aumento do apetite). Além destes sintomas existem outros que podem ocorrer, como perda de peso e visão turva. A diabetes pode ainda ter como manifestação inaugural uma das suas complicações agudas, como cetoacidose diabética e síndrome hiperosmolar hiperglicémica não cetótica (Portal da Saúde & Banco da Saúde, 2012).

Existem vários grupos de risco que apresentam uma maior predisposição ao aparecimento de diabetes *mellitus*, tais como, pessoas com familiares diretos com diabetes, homens e mulheres obesos, crianças com peso igual ou superior a 4kg à nascença, doentes com problemas no pâncreas ou com doenças endócrinas (Banco da Saúde, 2012).

Esta doença possui 3 tipos principais, diabetes *mellitus* tipo 1, tipo 2 e gestacional. A **diabetes *mellitus* tipo 2**, previamente designada diabetes não insulino-dependente ou diabetes tardio (Fig.1.2), apresenta um mecanismo fisiopatológico complexo. É o tipo de diabetes mais frequente, corresponde a 90% dos casos de diabetes e aparece normalmente na idade adulta. Neste tipo de diabetes observa-se uma diminuição na resposta dos recetores de glucose à insulina, o que conduz a uma resistência à ação da insulina. As células beta do pâncreas aumentam a produção de insulina e, com o passar dos anos, o mecanismo de resistência à ação da insulina acaba por levar as células beta à exaustão, pois a insulina produzida é insuficiente e o organismo tem cada vez mais dificuldade em transportar a glucose para as células (Portal da Saúde & Banco da Saúde, 2012).

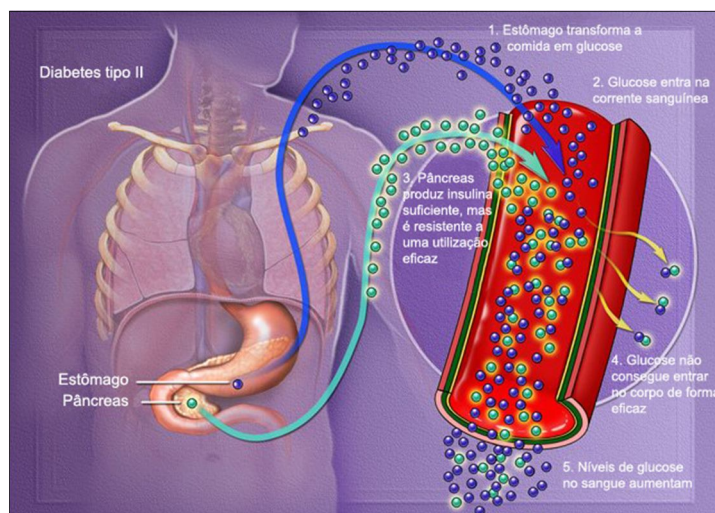


Figura 1.2 – Desenho esquemático da diabetes *mellitus* tipo 2
(Adaptado de: diabeticdietsnews.com/main-causes-of-diabetes-in-us-adults)

Um outro tipo de diabetes, é a **diabetes mellitus gestacional** (DMG) que resulta de uma secreção e de uma resposta à insulina inadequados, podendo-se assemelhar à diabetes tipo 2 em vários aspectos. A DMG surge durante a gravidez e pode desaparecer após o parto (Fig.1.3). Cerca de 20 a 50% das mulheres com DMG acabam por desenvolver diabetes tipo 2 mais tarde na vida. A DMG pode ocorrer em cerca de 2 a 7% das gravidezes, é temporária e se não for tratada pode vir a causar complicações à mãe e ao feto, tais como, macrossomia fetal (ou seja, peso elevado do bebé ao nascer), malformações fetais, incluindo cardíacas, do sistema nervoso central e dos músculos esqueléticos. A insulina fetal muito elevada pode inibir a produção de surfactante fetal e que pode causar problemas respiratórios no recém-nascido, no momento em que este entra em contato pela primeira vez com o oxigénio. A hiperbilirrubinemia pode causar a destruição dos glóbulos vermelhos, em muitas situações pode até ocorrer morte perinatal devido a uma má perfusão placentária provocada por danos vasculares (Portal da Saúde & Banco da Saúde, 2012).

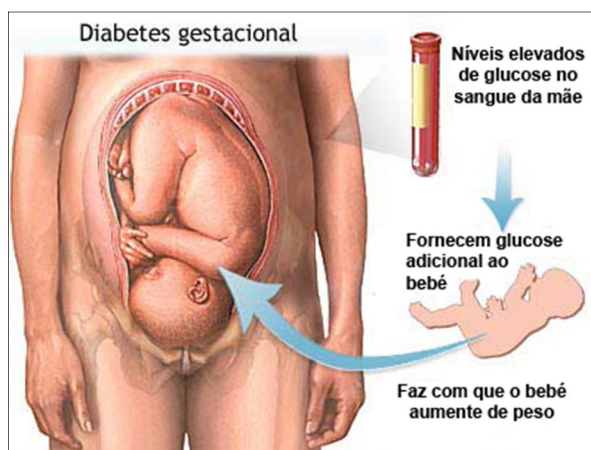


Figura 1.3 – Desenho esquemático da diabetes *mellitus* gestacional (Adaptado de: tudosobregravidez.blogspot.pt)

O tipo de diabetes abordado neste trabalho foi a **diabetes *mellitus* tipo 1**, previamente chamada de diabetes insulino-dependente. A diabetes tipo 1 (Fig.1.4) é um dos exemplos clássicos de doença auto-imune de um órgão específico, sendo caracterizada pela infiltração linfocítica ou inflamação dos ilhéus pancreáticos, também conhecido como insulite (Lee, 2011).

A diabetes tipo 1 resulta de uma complexa interação entre os diferentes graus de suscetibilidade genética e fatores ambientais (Vaarala, 2008). A patogénese da diabetes tipo 1 deve-se a vários fatores, existindo uma deficiência absoluta na secreção de insulina e propensão à cetoacidose (Craig, 2009).

A maioria dos casos de diabetes tipo 1 ocorrem devido à destruição das células beta dos ilhéus pancreáticos, sendo essa destruição mediada pelas células T. Neste processo vai havendo uma destruição progressiva das células beta, quando cerca de 90% é destruída manifesta-se a diabetes. (Craig, 2009).

Marcadores sorológicos de um processo patológico auto-imune, incluindo anticorpos anti-celulares dos ilhéus, tais como, GAD, IA-2, IA-2 β ou auto-anticorpos anti-insulina (IAA) estão presentes em 85 a 90% dos indivíduos quando é detetada a hiperglicemia. A suscetibilidade à diabetes tipo 1 auto-imune é determinada por múltiplos genes, e uma análise recente evidenciou 40 locais diferentes no genoma humano que podem estar associados à diabetes *mellitus* tipo 1. Os genes HLA (Human Leukocyte Antigen) são os que demonstram ter uma maior ligação à doença, existindo ainda ligações com combinações específicas de alelos nos loci DRB1, DQA1 e DQB1 com ambos os haplótipos sensíveis ou de proteção (Craig, 2009).

Os fatores ambientais, químicos e/ou virais, que iniciam a destruição das células beta do pâncreas são ainda desconhecidos, mas o processo começa meses ou anos antes da manifestação dos sintomas clínicos (Skylar, 2005; Verge, 1996). Infecções por enterovírus têm sido associadas com o desenvolvimento de diabetes, sendo que auto-anticorpos e enterovírus foram detectados nos ilhéus de indivíduos com diabetes (Dotta, 2007; Lonrot, 2000; Richardson, 2009; Sabbah, 2000; Sadeharju, 2003).

A diabetes tipo 1 está ainda associada à doença auto-imune da tiróide, à doença celíaca, à doença de Addison, e a outras doenças auto-imunes (Barker, 2006).

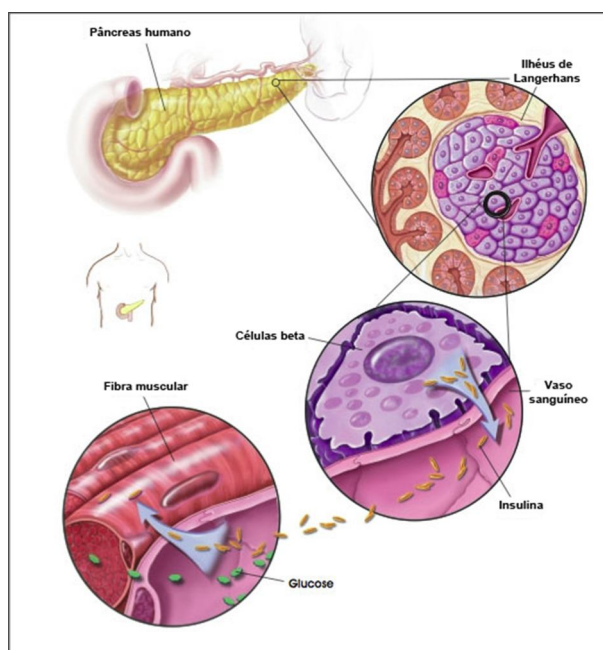


Figura 1.4 – Desenho esquemático da diabetes *mellitus* tipo 1 (Adaptado de: www.patologias.net)

De uma forma geral, pacientes com diabetes *mellitus* apresentam infecções mais frequentemente do que pessoas que não tem diabetes. Uma das possíveis causas para este aumento de prevalência de infecções é a imunidade ser “defeituosa”. Estudos celulares sobre a imunidade inata demonstraram um decréscimo nas funções de quimiotaxia, fagocitose e morte por parte das células diabéticas polimorfonucleares e dos monócitos/macrófagos em relação às células controle. Uma melhor regulação da diabetes *mellitus* leva a uma melhoria dessas funções celulares. Sabe-se que alguns microrganismos tornam-se mais virulentos num ambiente rico em glicose. Outro mecanismo que pode levar ao aumento de prevalência de infecções em pacientes diabéticos é um aumento da aderência de microrganismos a células diabéticas em comparação com as células não-diabéticas. Este fenómeno já foi descrito para

Candida albicans (Hostetter, 1990). Pensa-se que a existência de hidratos de carbono no recetor possa desencadear este fenómeno (Geerlings, 1999).

1.1.4 – Fatores Epidemiológicos da Diabetes *mellitus* em Portugal e no Mundo

Segundo o relatório anual do Observatório Nacional da Diabetes a prevalência da Diabetes em 2011 foi de 12,7% da população portuguesa com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, o que corresponde um valor estimado de 1 003 mil indivíduos. Em 2011, a taxa de prevalência da Diabetes revelou que, em 56% dos indivíduos já havia sido diagnosticada e em 44% ainda não tinha sido diagnosticada. Verifica-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa na prevalência da diabetes entre os homens e as mulheres (Fig.1.5) (Gardete, 2013).

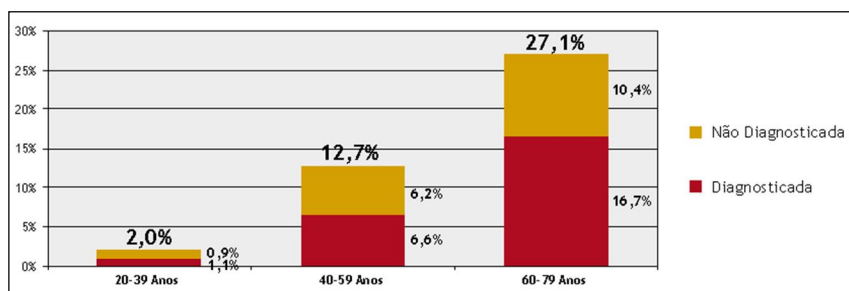


Figura 1.5 – Prevalência da diabetes em Portugal por sexo em 2011 (Fonte: PREVADIAB – SPD; Tratamento OND)

Verificou-se um crescimento do número de novos casos diagnosticados anualmente em Portugal na última década. Em 2011 foram detectados 652 novos casos de Diabetes por cada 100 000 habitantes (Gardete, 2013).

Tabela 1.2 – Incidência da diabetes em Portugal (Adaptado de: Médicos Sentinela – INSA)

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
N.º de novos casos por 100 000 indivíduos	606,4	460,8	511,1	581,9	571,1	623,5	651,8

A diabetes tipo 1 nas crianças e nos jovens em Portugal (Registo DOCE), em 2011, atingia mais de 3 mil indivíduos com idades entre 0 e os 19 anos, o que corresponde a 0,14 % da população portuguesa neste escalão etário, manifestando uma ligeira tendência de crescimento nos últimos anos (Gardete, 2013).

Tabela 1.3 – Prevalência da diabetes tipo 1 nas Crianças e nos Jovens em Portugal
(Adaptado de: Registo DOCE (DGS); Tratamento OND)

	2008	2009	2010	2011
N.º Casos Totais (0-14 anos)	1 578	1 662	1 738	1 764
Taxa de Prevalência da Diabetes tipo 1 (0-14 anos)	0,10%	0,10%	0,11%	0,11%
N.º Casos Totais (0-19 anos)	2 547	2 749	2 960	3 056
Taxa de Prevalência da Diabetes tipo 1 (0-19 anos)	0,12%	0,13%	0,14%	0,14%

A incidência da diabetes tipo 1 nas crianças e nos jovens tem vindo a aumentar significativamente nos últimos 10 anos em Portugal. Em 2011 foram detetados 16,3 novos casos de Diabetes tipo 1 por cada 100 000 jovens com idades compreendidas entre os 0 e os 14 anos (Gardete, 2013).

Tabela 1.4 – Incidência da diabetes tipo 1
(Adaptado de: Registo DOCE (DGS); Tratamento OND)

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
N.º de novos casos (0-14 anos)	264	248	267	314	310	321	256
N.º de casos por 100 000 indivíduos (0-14 anos)	16,1	15,1	16,4	19,3	19,2	20,0	16,3
N.º de novos casos (0-19 anos)	281	285	313	364	357	382	291
N.º de casos por 100 000 indivíduos (0-19 anos)	12,6	12,8	14,2	16,6	16,4	17,6	13,6

Na maioria dos países ocidentais, a diabetes tipo 1 é responsável por mais de 90% dos casos de diabetes na infância e na adolescência, embora menos de metade dos indivíduos com diabetes tipo 1 sejam diagnosticados antes dos 15 anos de idade. Estudos de incidência epidemiológica definem o aparecimento da diabetes tipo 1 a partir da data da primeira injeção de insulina, devido ao intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico (Craig, 2009).

A incidência da diabetes tipo 1 varia muito entre os diferentes países, dentro dos países e entre diferentes populações étnicas. Na Europa as taxas de incidência mostram uma correlação estreita com a frequência de genes HLA susceptíveis, na população em geral. Na Ásia, a incidência de diabetes tipo 1 é extremamente baixa: na China 0,1 por 100000, no Japão 2,4 por 100000 e têm uma combinação HLA única e diferente em comparação com os caucasianos. Além disso, existe uma forma distinta e progressivamente lenta de diabetes tipo 1 no Japão, o que representa aproximadamente um terço dos casos de diabetes tipo 1 (Craig, 2009).

O aumento da incidência de diabetes tipo 1 está associada com o aumento da proporção de indivíduos com genótipos de HLA de baixo risco em certas populações. A variação sazonal no aparecimento de novos casos está bem descrita, sendo o pico nos meses de inverno. Apesar do património genético familiar, que corresponde aproximadamente a 10% dos casos de diabetes tipo 1, não há um padrão reconhecível dessa herança. A diabetes tipo 1 é 2 a 3 vezes mais comum em filhos de homens diabéticos (3,6 a 8,5%) em comparação com filhos de mulheres diabéticas (1,3 a 3,6%) (Craig, 2009).

1.2 – Microbiota intestinal e a Diabetes *mellitus* tipo 1

1.2.1 – Composição microbiana do trato gastrointestinal (TGI)

A Microbiota é uma comunidade de microrganismos, constituída por microrganismos característicos do habitat em questão; pode ser constituído por diferentes Filos bacterianos, arqueobactérias, microrganismos eucariotas e vírus (Harris, 2012).

A microbiota está associada a cada organismo multicelular que existe na Terra (Harris, 2012). Estima-se que nos seres humanos existam aproximadamente 10^{14} microrganismos, em várias partes do corpo, tais como à superfície da pele, no sistema respiratório, gastrointestinal e genito-urinário (Gerritsen, 2011; Harris, 2012; Hattori, 2009; Prakash, 2011a; Sekirov, 2010).

O trato gastrointestinal nos seres humanos é o que apresenta maior número de microrganismos, sendo composto por compartimentos especializados, tais como a boca, esófago, estômago, intestino delgado e o intestino grosso. Cada um destes compartimentos tem funções fisiológicas e estruturas anatómicas únicas. Como resultado, o ambiente químico e os microrganismos que o habitam diferem muito de compartimento para compartimento (Fig.1.6) (Harris, 2012).

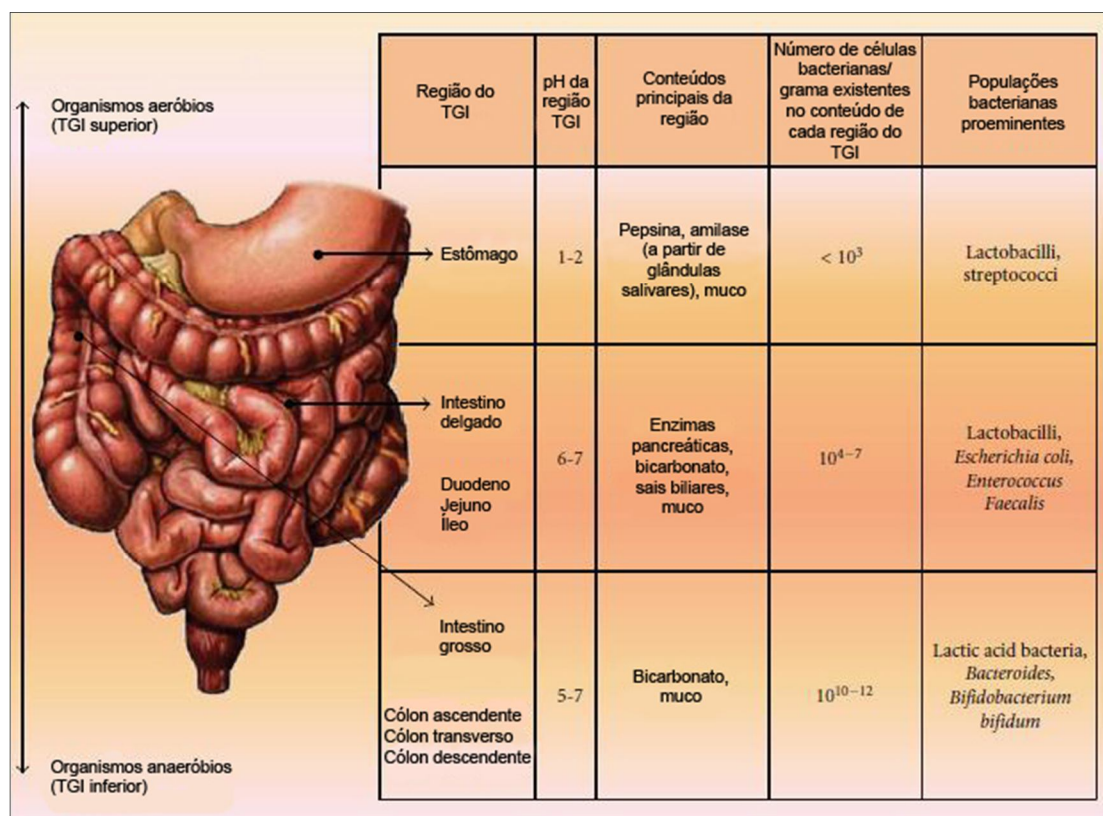


Figura 1.6 – Características da microbiota do trato gastrointestinal (distribuição de oxigénio ao longo do trato gastrointestinal, valor de pH, quantificação e diversidade da população bacteriana) (Adaptado de: Prakash, 2011a)

A maioria das bactérias intestinais residem na parte inferior do trato digestivo, no intestino grosso, uma vez que o trato superior apresenta níveis elevados de acidez, bílis e secreções pancreáticas, que são tóxicas para a maioria dos microrganismos (Prakash, 2011a).

A microbiota intestinal é constituída por setes Filos bacterianos, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* e *Actinobacteria*, sendo que as espécies mais abundantes pertencem ao Filo *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Prakash, 2011b).

A porção superior do trato gastrointestinal, composto pelo estômago e duodeno, abriga quantidades de microrganismos muito pequenas, em que os microrganismos predominantes pertencem aos géneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Os principais géneros de bactérias anaeróbias facultativas presentes no intestino delgado são *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Proteus*. No intestino grosso, o trato já é densamente povoado por anaeróbios, sendo os géneros dominantes, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus*. (Prakash, 2011a).

A colonização do intestino humano com microrganismos começa imediatamente após o nascimento (Fig.1.7). Após a passagem pelo canal de parto, os fetos são expostos a uma população microbiana complexa. A prova de que o contacto imediato com os microrganismos durante o parto pode afetar o desenvolvimento da microbiota intestinal, vem do facto de que a microbiota intestinal dos lactentes e da microbiota vaginal das mães apresentam semelhanças. Além disso, os bebés nascidos por cesariana têm diferentes composições microbianas, em comparação com os bebés nascidos de parto eutócico. Após o estabelecimento inicial da microbiota intestinal e durante o primeiro ano de vida, a composição microbiana do intestino do mamífero é relativamente simples e varia entre indivíduos e também com o tempo. Com um ano de idade a microbiota intestinal das crianças começa a parecer-se com a de um jovem adulto e estabiliza (Sekirov, 2010).

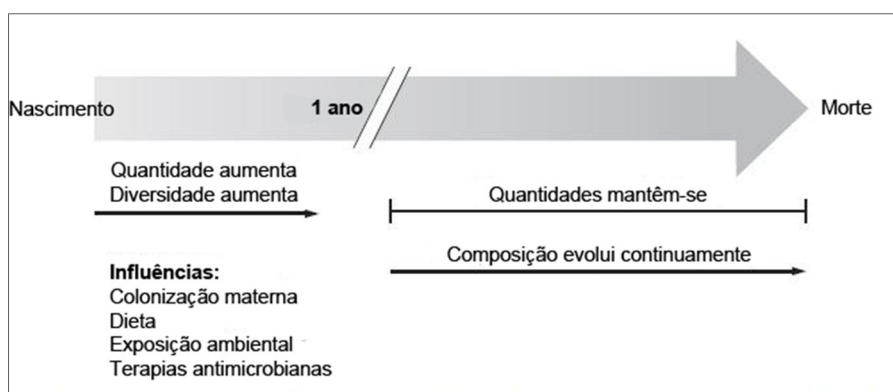


Figura 1.7 – Aspectos temporais do estabelecimento e manutenção da microbiota e os fatores que influenciam a composição microbiana (Adaptado de: Serikov, 2010)

1.2.2 – Funções da microbiota no trato gastrointestinal (TGI)

O genoma coletivo da microbiota intestinal do ser humano, ou como é designado, o microbioma intestinal humano, contém mais de 3 milhões de genes microbianos, o que corresponde a cerca de 150 vezes mais genes do que o genoma humano. A presença desta grande variedade de genes em adição ao nosso próprio genoma, sugere que exista uma profunda influência dos microrganismos intestinais no corpo humano. A microbiota intestinal desempenha um papel em vários processos fundamentais ao corpo humano, tais como, processos metabólicos, nutricionais, fisiológicos e imunológicos (Gerritsen, 2011).

As funções metabólicas da microbiota intestinal incluem a produção de vitaminas, a síntese de aminoácidos e a biotransformação de ácidos biliares. Esta última realizada por enzimas microbianas, tem implicações no metabolismo do colesterol e da glicose. O

microbioma fornece as vias bioquímicas necessárias para a fermentação de substratos não digeríveis e de muco endógeno. Através da fermentação, o crescimento bacteriano é estimulado produzindo ácidos gordos de cadeia curta e gases (Prakash, 2011b).

Os principais ácidos gordos de cadeia curta que são produzidos pela microbiota intestinal são o acetato, butirato e propionato. Outros produtos finais bacterianos incluem lactato, etanol, succinato, formato, valerato, caproato, isobutirato, 2-metil-butirato e isovalerato. A fermentação acontece no cego e no cólon, em que os ácidos gordos de cadeia curta são absorvidos, estimulando a absorção de sais e água. Uma propriedade dos ácidos gordos de cadeia curta é o seu efeito trófico no epitélio intestinal. O butirato é a fonte de energia preferida das células epiteliais e é quase totalmente eliminado pelo epitélio do colón. O acetato é o principal ácido gordo de cadeia curta presente no colón sendo o substrato principal na síntese do colesterol (Prakash, 2011b).

A resistência à colonização é uma função adquirida pela microbiota intestinal. Nesta situação os microrganismos comensais previnem a colonização do TGI por microrganismos patogénicos através da competição pelos locais de fixação e pelos nutrientes, e também através da produção e secreção de agentes antimicrobianos. Estes mecanismos são relevantes para a redução do nível de lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, motivos CpG-DNA bacterianos e superantígenos que podem ser prejudiciais para o hospedeiro. A microbiota autóctone é também essencial para o desenvolvimento do sistema imunitário e garante uma estrutura e função (Prakash, 2011b).

Estas vias metabólicas, não só permitem aos microrganismos gerar a sua própria energia para o seu crescimento e proliferação, como exercem influência no hospedeiro. No geral, a interacção metabólica entre microrganismos e o ser humano (hospedeiro) é benéfica para ambas as partes (Gerritsen, 2011).

1.2.3 – Microbiota intestinal e o seu papel na saúde e na doença

A microbiota intestinal e o seu hospedeiro coevoluíram, ou seja, a evolução humana ocorreu em simultâneo com a evolução dos microrganismos. Estes microrganismos simbióticos ocuparam os variados nichos oferecidos pelo TGI e adaptaram-se às circunstâncias locais. Os microrganismos, por sua vez, podem ter influenciado a evolução humana em termos de exigências nutricionais e metabólicas. Em última análise, o Homem depende da sua microbiota intestinal para uma série de funções vitais, portanto estes microrganismos também contribuem para a saúde. A perturbação da composição da

microbiota, também conhecida como disbiose, foi reconhecida em várias doenças, sendo que muitas delas estão associadas ao TGI (Gerritsen, 2011).

A disbiose tanto pode ser um biomarcador como um potencial factor que contribui para o aparecimento de doenças inflamatórias, quer no ser humano, quer em animais (Hill, 2010).

Um certo número de doenças têm sido associadas a alterações da microbiota intestinal, pelo que, conhecendo a relação exacta entre as duas, consegue-se iniciar com sucesso um tratamento ou prevenção dessas doenças através da modulação do número e/ou das espécies de microrganismos presentes. Alguns dos distúrbios associados a variações da microbiota incluem cancro de cólon, hipercolesterolemia (Prakash, 2011a); doença de Crohn, obesidade, diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2, autismo (Sekirov, 2010); alergias, asma (Hill, 2010).

Surpreendentemente, a microbiota “normal” também contém microrganismos que demonstraram, em condições particulares, induzir inflamação (Turnbaugh, 2006). Por conseguinte, a microbiota tem o potencial para exercer ambas as respostas, pró- e anti-inflamatória, e a composição das comunidades bacterianas no intestino parece estar intimamente ligada ao bom funcionamento do sistema imunitário. O sistema imunológico é responsável por reconhecer, responder e adaptar-se a inúmeras moléculas estranhas e por isso é tão importante em condições de saúde ou doença. Embora se pense que o sistema imune evoluiu no sentido de proteger contra infeções por agentes patogénicos microbianos, o ser humano e os animais coexistem com uma vasta e complexa microbiota, que interage exaustivamente com o sistema imunitário dos seus hospedeiros (Round, 2009).

1.2.4 – Interação entre a microbiota intestinal e o sistema imune

As bactérias comensais que habitam o TGI humano são essenciais para um bom desenvolvimento e funcionamento do sistema imune. Vários estudos revelaram que determinadas espécies da microbiota podem induzir diferentes tipos de células do sistema imunitário, tais como, células T helper 1 e 17, células T reguladoras (Tregs) e Imunoglobina A (IgA), e são capazes ainda de induzir respostas, o que nos sugere que a composição da microbiota é de extrema importância na resposta imune (Kosiewicz, 2011).

A microbiota que reside no TGI é muito variada, e certas espécies em determinadas situações apresentam funções distintas e opostas, podendo mesmo afectar o desenvolvimento de doenças em outros órgãos que não pertençam ao TGI. A gama de efeitos por elas demonstrados, varia desde a indução e exacerbação até à inibição e protecção (Kosiewicz, 2011).

O desenvolvimento e maturação do sistema imunitário é profundamente afetado pela microbiota, logo não é de estranhar que esta influencie o desenvolvimento e/ou progressão de doenças inflamatórias e auto-imunes, como é o caso da diabetes *mellitus* tipo 1 (Kosiewicz, 2011).

Dados epidemiológicos revelaram que existe uma prevalência desproporcional de doenças auto-imunes em países desenvolvidos. Esta premissa constitui a base para a “Hipótese da Higiene”, que por sua vez sugere que uma diminuição da exposição a microrganismos, tanto patogénicos como simbiotes, durante a infância altera o natural desenvolvimento do sistema imune, o que faz com que ocorra uma predisposição para a perda de auto-tolerância. Esta hipótese deu origem à ideia, de que uma microbiota alterada pode ser o factor de predisposição para o desenvolvimento do fenómeno de auto-imunidade (Boerner, 2011).

1.2.5 – Como a microbiota e o sistema imune influenciam o aparecimento de diabetes *mellitus* tipo 1

Os estudos e ensaios realizados dos últimos anos, sugerem que o intestino e a microbiota que o constituem, possam estar envolvidos na patogénese da diabetes *mellitus* tipo 1, sendo esta mediada pelo sistema imune (Boerner, 2011; Burcelin, 2011; Giongo, 2011; Kosiewicz, 2011; Lee, 2010; Salzman, 2011; Sekirov, 2010; Vaarala, 2008; Wen, 2008). Parecem existir diversos mecanismos pelos quais esse efeito pode ser mediado, tais como, a diminuição da diversidade microbiana no TGI; o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, fenómeno mais conhecido por “leaky gut”; inflamação local do TGI e respostas imunes anormais por parte da mucosa, são os vários factores que contribuem para o aparecimento da auto-imunidade das células beta pancreáticas e que leva a uma progressão da diabetes tipo 1 (Knip, 2009; Vaarala, 2008).

A exposição a agentes virais ambientais também está associada com a incidência de diabetes tipo 1 (Like, 1991).

Existem vários mecanismos subjacentes à “Hipótese da Higiene”, que são: a ausência de carga microbiana na infância; a predisposição ao aparecimento de doenças alérgicas devido a desvios das células T helper tipo 1 e 2; maturação defeituosa das células T reguladoras como consequência dos estilos de vida modernos; competição antigénica de agentes infecciosos que inibem respostas de antigénios fracos; proteção contra doenças alérgicas através de mecanismos independentes dos seus antigénios constitutivos, que estimulam os

receptores de antigénios não específicos; e desenvolvimento de uma resposta imune agressiva causada por uma imuno-reatividade genética desencadeada pela disbiose (Prakash, 2011a).

Nos seres humanos a incidência da diabetes tipo 1 aumentou durante as últimas décadas nos países desenvolvidos, onde as condições ambientais se têm alterado de forma dramática. Esta hipótese sugere que os antigénios bacterianos seriam expostos pelo sistema de imunidade inata aos linfócitos T logo após o nascimento, o que sugere que a imuno-estimulação pode beneficiar da maturação pós-natal do sistema imunitário. No caso de não ocorrer um reconhecimento do antigénio bacteriano, o sistema imune adaptado vai reagir no sentido de exacerbar a sua agressividade perante um invasor, e vai atacar as células pancreáticas destruindo-as. Este processo em que não há reconhecimento do antigénio, vai ser um dos factores que irá desencadear várias doenças auto-imunes, como a diabetes tipo 1 (Burcelin, 2011).

Os receptores TLR (Toll-like receptor) são receptores de reconhecimento do sistema imune inato. Estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra agentes patogénicos e são responsáveis por manter a integridade do tecido epitelial do intestino. A molécula de sinalização que se adapta a este receptor é a MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) que, uma vez funcional, evita o desenvolvimento da diabetes tipo 1. A inactivação (KO) da MyD88 leva a um processo de disbiose, o que pode levar ao aparecimento de diabetes tipo 1 (Burcelin, 2011; Prakash, 2011a).

A qualidade da microbiota intestinal e a activação do sistema de imunidade inata são importantes para controlar a agressividade dos linfócitos T e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças auto-imunes (Burcelin, 2011).

Para estudar a diabetes tipo 1, foi criado um modelo animal, os ratinhos Biobreding, propensos à diabetes (BB-DP) ou resistentes à diabetes (BB-DR). A análise da microbiota intestinal destes ratinhos permitiu a identificação da presença de *Lactobacillus* nas fezes destes animais, e em particular duas espécies, *L. johnsonii* e *L. reuteri* (Valladares, 2010). Observou-se uma diminuição da incidência da diabetes tipo 1 e da sua progressão, quando os animais propensos à diabetes são expostos a estas duas espécies bacterianas (Valladares, 2010). O mecanismo de acção destas duas bactérias pensa-se ser a indução de alterações nas proteínas da mucosa intestinal e respostas ao stress oxidativo, por forma a diminuir os níveis de IFN γ (interferão-gama) (Burcelin, 2011; Giongo, 2011; Sekirov, 2010; Vaarala, 2008).

Roesch e colaboradores (2009), realizaram um estudo em que analisaram as bactérias intestinais de ratinhos Biobreding, propensos à diabetes e resistentes à diabetes. Concluíram que no início do desenvolvimento da diabetes as comunidades bacterianas nestas duas

linhagens de ratinhos apresentavam diferenças significativas. Os ratinhos resistentes à diabetes apresentavam populações muito elevadas de bactérias com carácter probiótico, tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, enquanto os ratinhos propensos à diabetes tinham quantidades mais elevadas de *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Ruminococcus* (Roesch, 2009).

Segundo Vaarala e colaboradores (2008) existe um trio de factores que segundo eles cria a “tempestade perfeita” de eventos que levam à auto-imunidade na diabetes *mellitus* tipo 1. Esses factores incluem uma microbiota intestinal anormal, uma mucosa intestinal permeável e uma capacidade de resposta imune intestinal alterada (Vaarala, 2008).

A interacção destes factores parece ter um papel crucial no aparecimento de várias doenças auto-imunes e alérgicas, incluindo a doença de Crohn, a doença celíaca, a esclerose múltipla e a diabetes *mellitus* tipo 1 (Frank, 2007; Wen, 2008; Willing, 2009).

No estudo de Giongo e colaboradores (2011), eles verificaram que as duas diferenças mais marcantes entre as comunidades microbianas saudáveis (não auto-imune) e auto-imune, provenientes de fezes humanas, foram as diferenças entre os dois filos mais abundantes, Bacteroidetes e Firmicutes. E esta disbiose observada no intestino humano tem sido apontada como a causa de várias desordens patológicas (Giongo, 2011).

Este estudo identificou bactérias muito abundantes nos microbiomas intestinais, que estão negativa e positivamente correlacionadas com o desenvolvimento de auto-imunidade em crianças cuja predisposição para o aparecimento da diabetes tipo 1 é muito elevado. Este microbioma instável e “não saudável”, foi por eles designado como microbioma auto-imune para a diabetes tipo 1 (Giongo, 2011).

No intestino humano, uma diversidade limitada pode conduzir a uma reduzida capacidade de digerir uma dieta variada, podendo levar a níveis de energia mais baixos em indivíduos afectados, assim, uma comunidade microbiana intestinal que apresente uma menor diversidade pode originar indivíduos menos saudáveis e pode ainda ser um indicador de um estado de doença (Giongo, 2011).

Segundo Giongo (2011), o microbioma auto-imune da diabetes tipo 1, tende a ter mais membros, mas apresenta uma diminuição da diversidade e uma reduzida estabilidade quando comparado com um microbioma saudável (Giongo, 2011).

Sabe-se que certas proteínas das junções interepiteliais, “tight junction”, como a zonulina, certos probióticos e ácidos gordos de cadeia curta (por exemplo, o butirato) podem desempenhar um papel na modulação do “intestino permeável”. Alguns estudos sugerem ainda que uma exposição precoce a alimentos contendo gliadina (proteína do trigo) e/ou insulina bovina (proteína do leite) durante a infância aumenta o risco de auto-imunidade das

células beta, o que pode ser explicado pela indução da inflamação intestinal. A insulina bovina pode ainda sensibilizar as células T intestinais numa fase inicial da vida, para mais tarde virem a participar numa destruição auto-imune das células beta, que segregam a insulina humana (Knip, 2009; Vaarala, 2008).

1.3 – A análise Proteómica da microbiota

1.3.1 – Princípios Teóricos

A técnica de electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, comumente conhecida como 2-DE, foi descrita pela primeira vez em 1975 por O'Farrell e Klose. Esta técnica de electroforese, permitiu pela primeira vez, a separação de uma mistura complexa de proteínas nos seus componentes individuais. Este campo de investigação passou a ser conhecido como Proteómica (Proteomics), em que as **proteínas** expressas pelo **genoma** tomaram a designação de **proteoma**, um termo usado pela primeira vez em público por Marc Wilkins na primeira conferência de Proteómica em Siena no ano de 1994 (Klein, 2004).

Proteómica é o termo usado para descrever os estudos que analisam o complemento global de proteínas presente num organismo, tecido ou comunidade. O proteoma consiste em todas as proteínas que são expressas por um organismo sob um dado conjunto de condições, e portanto, representam o complemento funcional do genoma. O proteoma representa o produto da expressão global do gene (transcrição e tradução), a estabilidade da proteína e o processamento e *turnover* da proteína (Fig.1.8). A proteómica vai mais além das análises genómicas, que descrevem a capacidade teórica de um organismo ou comunidade, fornecendo uma medida direta, das proteínas que são sintetizadas, de quando são sintetizadas e qual a sua abundância celular e extracelular (Burg, 2011).

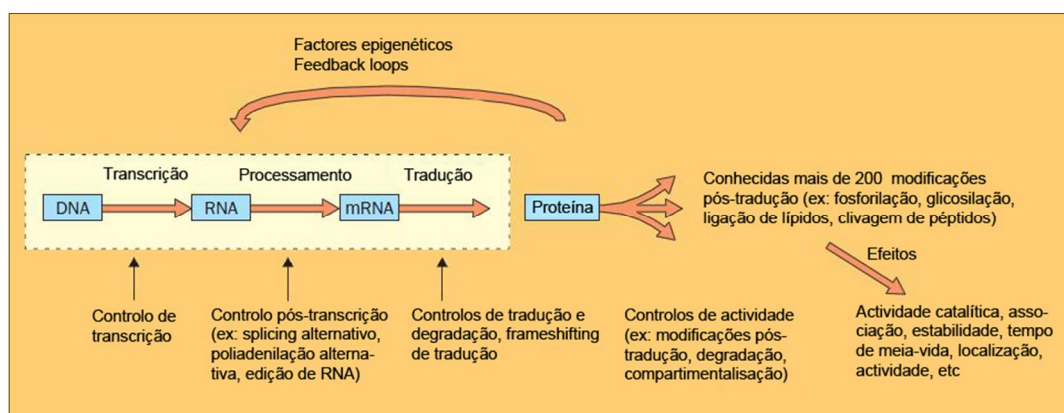


Figura 1.8 – As vias nas quais a expressão do gene e da proteína podem ser reguladas ou modificadas desde a transcrição até após a tradução (Adaptado de: Banks, 2000)

As proteínas na electroforese bi-dimensional são primeiro separadas pela carga na 1ª dimensão e depois pelo peso molecular na 2ª dimensão (Banks, 2000). A 1ª dimensão consiste na Focagem Isoeléctrica (IEF) e a 2ª dimensão no SDS-PAGE (do inglês sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH utilizado, a técnica 2-DE pode revelar aproximadamente 2000 proteínas, podendo detectar apenas um 1 ng de proteína por ponto proteico. Além disso, a técnica consegue criar um “mapa de proteínas” completamente intactas, em que se conseguem observar as alterações nos níveis de expressão da proteína, nas isoformas e nas modificações pós-tradução. Uma das grandes vantagens que esta técnica possui é a capacidade de estudar proteínas que tenham sofrido qualquer tipo de modificação pós-tradução, tais como fosforilação, glicosilação ou proteólise limitada, o que pode em muitos casos ser facilmente localizado nos géis 2-DE como pontos em linha, quer no eixo horizontal ou vertical dos géis (Görg, 2004).

A amostra (por exemplo: tecidos, soro, etc) é sujeita a solubilização e as proteínas são desnaturadas nas suas subunidades polipeptídicas. Esta mistura é separada por focagem isoeléctrica; quando se aplica uma corrente eléctrica as subunidades polipeptídicas carregadas migram ao longo de uma tira de gel de poliacrilamida que contém um gradiente de pH imobilizado, até que atinjam o pH em que a sua carga total é neutra, também conhecido como ponto isoeléctrico ou pI, portanto as proteínas existentes na amostra vão-se posicionar ao longo da tira de gel de acordo com o seu pI. Esta tira de gel é então aplicada na borda do gel de poliacrilamida retangular e os polipéptidos já focados irão migrar segundo uma corrente eléctrica para o segundo gel e neste gel serão separados com base no peso molecular (Banks, 2000).

Depois de terminada a 2ª dimensão, procede-se à coloração dos géis, que pode ser feita pela aplicação de corantes como o nitrato de prata ou *Coomassie Blue* e ainda os corantes luminescentes como o *SYPRO Ruby*.

A análise dos géis é feita por um *software* de imagem especializado para géis 2-DE. Este *software* permite comparar múltiplos géis e através de ligações online pode-se aceder a bancos de dados de proteomas. As proteínas expressas podem ser analisadas de várias formas: se estão presentes ou ausentes numa determinada condição, pelo volume da proteína produzida ou ainda pelas diferentes conformações que a proteína pode apresentar. As proteínas de interesse podem ainda ser identificadas com base no conhecimento do ponto isoeléctrico e aparente peso molecular obtido a partir dos géis bidimensionais (Banks, 2000).

Após a análise, o ponto proteico de interesse é excisado do gel, digerido com tripsina para clivar a proteína em sequências de aminoácidos específicas. As massas dos péptidos são

então avaliadas por espectrometria de massa; MALDI TOF ou ESI MS/MS que dará origem a uma impressão digital, conhecido como *peptide mass fingerprint* (Banks, 2000).

A análise proteómica, nos últimos anos tem sido utilizada em várias áreas: no desenvolvimento de novas terapias e drogas medicamentosas; no estudo de desordens neurológicas como a doença de Creutzfeld-Jakob, na procura de priões (proteínas defeituosas); no estudo de doenças infecciosas como a tuberculose que é provocada pelo microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*, em que procuram estudar quais os factores de virulência de cada estirpe; e no estudo de doenças cardíacas e do cancro, em que pesquisam novos biomarcadores (Banks, 2000).

Klaassens e colaboradores (2007), investigaram a potencial utilização da proteómica na caracterização da microbiota fecal humana. Eles concluíram que abordagens proteómicas podem ser ferramentas úteis para monitorizar os produtos funcionais da microbiota nas fezes ao longo do tempo em função de alterações na dieta alimentar, na esperança média de vida, na saúde e doença (Klaassens, 2007).

Verberkmoes e colaboradores (2009), utilizaram uma nova abordagem proteómica não direccionada, conhecida por *shotgun mass-spectrometry based*. O objectivo foi obter um alto rendimento, tendo por base a técnica mencionada, para determinar a identidade de milhares de proteínas microbianas no tipo de amostra mais complexa que se conhece, as fezes. Na técnica de *shotgun* não há necessidade de recorrer a um gel (*gel-free*) para se efectuar a separação do proteoma, em vez disso, os péptidos resultantes de uma digestão enzimática do proteoma, são separados por cromatografia líquida, e através de ionização por *electrospray* são injectados directamente em espectrómetros de massa (2D-LC-MS/MS). Este grupo de investigadores concluiu que a proteómica permite-nos conhecer as interacções bacterianas comensais que existem no hospedeiro (Verberkmoes, 2009).

1.3.2 – Análise Proteómica aplicada ao estudo da Diabetes

Do nosso conhecimento o presente estudo é o primeiro a realizar a análise do proteoma da microbiota intestinal em indivíduos com diabetes tipo 1, no entanto outros estudos têm utilizado abordagens proteómicas no contexto desta doença, nomeadamente Merchand e Klein (2010) utilizaram a proteómica para descobrir biomarcadores para a nefropatia diabética. A nefropatia diabética é uma complicação a nível microvascular que ocorre em alguns indivíduos com diabetes. Sabendo o papel das proteínas como reguladoras

de respostas celulares, este método que fornece informação qualitativa e quantitativa de abundância proteica pode ser útil na compreensão na patogénese de complicações diabéticas. Com base na descoberta do aumento do risco de disfunção renal progressiva em pacientes com microalbuminúria, a quantificação de proteínas na urina foi aceite como um biomarcador preditivo da doença renal diabética (Merchant e Klein, 2010).

Overgaard e colaboradores (2010), também utilizaram a análise proteómica para identificar novos biomarcadores da nefropatia diabética a partir do proteoma do plasma sanguíneo de pacientes com diabetes tipo 1 (Overgaard, 2010).

Segundo Balaban, o proteoma da mitocôndria também varia muito entre tecidos, dependendo dos seus requisitos funcionais. Verificou que as quantidades de proteína depositada na mitocôndria aumentaram, e que as mudanças pós-tradução são específicas para certos tecidos e doenças, ocorrendo também modificação da função e da localização da proteína e/ou enzima na mitocôndria. Neste estudo verificaram que quando ocorrem variações nas proteínas mitocôndriais durante a diabetes, as alterações abrangem toda a via metabólica e não apenas uma ou duas enzimas (Balaban, 2010).

A descoberta de biomarcadores para a diabetes tipo 1, foi útil para uma série de finalidades, incluindo a previsão de doença, compreensão do mecanismo de doença, para monitorizar a resposta à terapia aplicada e ainda para avaliar o risco de possíveis complicações diabéticas. Zhi e colaboradores (2010) além do plasma, utilizaram também o soro, pois são amostras biológicas extremamente ricas em informação.

Uma das principais causas de cegueira em adultos, é a retinopatia diabética, que é uma complicação prevalente e profunda da diabetes. VanGuilder e colaboradores, através de uma abordagem com múltiplas técnicas proteómicas (DIGE, LC-MS, etc) analisaram o proteoma da retina com o objectivo de compreender quais as alterações proteómicas que a retina sofre durante a doença (Van Guilder, 2011).

1.4 – O metaboloma

1.4.1 – Princípios Teóricos

A análise metabolómica é uma técnica utilizada na identificação e quantificação de metabolitos de um organismo ou de uma amostra biológica. É uma ferramenta muito utilizada para investigar as complexas interações entre metabolitos e qual o papel regulador que estes

desempenham na interação entre genes, transcritos e proteínas, como por exemplo, a regulação alostérica (Dunn, 2011; Idle, 2007).

Os metabolitos definem-se como moléculas de baixo peso molecular, até 1kDa, comparativamente com o peso molecular de proteínas e ácidos nucleicos. Podem ter uma origem orgânica ou inorgânica, podem ser moléculas reagentes, intermediárias ou produtos finais de reacções bioquímicas mediadas por enzimas, sendo que a maioria dos metabolitos é de origem orgânica (Dunn, 2011).

Devido à enorme variedade de metabolitos e diversidade na sua constituição tem-se uma vasta gama de propriedades físico-químicas, onde se incluem, o peso molecular, hidrofobicidade/hidrofilicidade, acidez/basicidade, ponto de ebulição, entre outras. Os metabolitos podem ainda ser classificados em termos de polaridade, polares ou não polares, e da sua estrutura (Dunn, 2011).

Em termos quantitativos, o conjunto de metabolitos presentes num sistema biológico é designado por metaboloma. Os metabolomas podem ser classificados de acordo com a sua origem: endometaboloma (metabolismo intracelular) e exometaboloma (metabolismo extracelular). Nos mamíferos, o metaboloma pode ser de diferentes origens, como por exemplo, plasma sanguíneo, urina, líquido céfalo-raquidiano, lágrimas, saliva, fezes e uma variedade imensa de tecidos e epitélios (Dunn, 2011).

O metaboloma é composto por metabolitos com diferentes origens e de diferentes processos metabólicos (ex: catabolismo e anabolismo), tais como, péptidos (ex: glutatona), aminoácidos (ex: alanina), monossacárideos (ex: glucose), dissacarídeos (ex: trealose), fosfolípidos (ex: cardiolipina), coenzimas (ex: NADH), nucleótidos, piruvato, citrato, e muitos outros (Dunn, 2011).

Em certas situações, fala-se de metabonómica em vez de metabolómica, mas ambas estão corretas. Enquanto a metabolómica procura uma descrição analítica de amostras biológicas complexas e tenta quantificar todas as moléculas presentes na amostra em estudo, a metabonómica procura medir e avaliar a resposta metabólica dos sistemas vivos a estímulos biológicos ou manipulação genética. Ou seja, a metabolómica estuda quais os metabolitos presentes na amostra e a metabonómica estuda quais os efeitos desses metabolitos no sistema vivo que forneceu a amostra (Nicholson, 2008).

Antes de se proceder à identificação dos vários metabolitos que constituem a amostra que se pretende estudar, é preciso recorrer a métodos de separação, tais como, cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e electroforese capilar (CE). Os métodos de detecção mais utilizados na análise metabolómica são: espectrometria de

massa (MS) e ressonância magnética nuclear (NMR). Na maior parte das vezes estes métodos de separação e deteção encontram-se acoplados, ou seja, procede-se à separação da amostra e deteção em simultâneo, isto nos casos em que é necessário separar a amostra.

A análise metabolómica pode ser utilizada em diferentes áreas de estudo, tais como, genómica funcional, toxicologia, genómica nutricional, lipidómica, patologias diversas, entre outras.

1.4.2 – Análise Metabolómica aplicada ao estudo da Diabetes

A análise metabolómica, nos últimos anos, permitiu enriquecer os conhecimentos sobre os processos fisiológicos e fisiopatológicos subjacentes à diabetes *mellitus* (Brugnara, 2012).

A metabolómica oferece algumas vantagens em relação a outras tecnologias “ómicas”, tais como, genómica, transcriptómica e proteómica. Esta tecnologia permite medir o fenótipo químico, que é o somatório da genómica, transcriptómica e da variabilidade proteómica, que de certa forma proporciona um perfil mais integrado no estado biológico. Além disso, a metabolómica é uma técnica rigorosa, muito utilizada no estudo de mecanismos de ação e possíveis efeitos toxicológicos de drogas de uso terapêutico (Bain, 2009).

As duas técnicas mais utilizadas na medição dos níveis de metabolitos em amostras biológicas são o NMR e o MS (Bain, 2009).

A espectroscopia por H^1 NMR de alta resolução, em teoria, pode detectar qualquer molécula orgânica, devido a esta possuir protões (núcleos de hidrogénio). Uma molécula colocada dentro de um elevado campo magnético, conforme a energia que possui, assim ela se irá comportar, podendo-se opor ao campo magnético ou posicionar-se paralelamente ao campo magnético. Esta diferença de energia também depende do ambiente químico em que os protões da molécula se encontram, o que de certa forma proporciona uma impressão digital “chemical fingerprint” da molécula (Griffin, 2008).

Alterações que ocorrem nos perfis metabólicos são uma potencial fonte de biomarcadores fisiológicos. Suhre e colaboradores (2010) aplicaram este tipo de estudo para a diabetes tipo 2 e usando uma abordagem metabólica conseguiram identificar novos marcadores de diabetes tipo 2 (Suhre, 2010).

Alguns estudos já demonstraram que o microbioma intestinal influencia o perfil metabólico dos órgãos, sangue e urina do hospedeiro. E os metabolitos de baixo peso molecular que são produzidos pela microbiota intestinal, são constantemente absorvidos pelo

lúmen intestinal e são transportados pela circulação sistêmica, logo vão ter um papel de extrema importância na saúde e doença do hospedeiro. Os metabolitos mais investigados nos últimos tempos são metabolitos muito específicos, como os ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) e as poliaminas (PAs) (Matsumoto, 2012).

A análise metabólica com recurso à espectroscopia de H^1 NMR, já foi utilizada em vários estudos: análise de metabolitos existentes no plasma sanguíneo de ratinhos diabéticos e saudáveis por Dumas *et al.* (2007); análise de soro sanguíneo para diagnosticar a nefropatia diabética em 182 indivíduos portadores de diabetes tipo 1 por Mäkinen *et al.* (2006) e ainda analisaram um conjunto de lípidos, em especial a esfingomiélna, com o objectivo de descobrir possíveis candidatos a biomarcadores e mediadores lipídicos de dano vascular em lesões renais (Mäkinen, 2012). No estudo de Orešic *et al.*, (2008) verificaram que os níveis séricos de fosfatidilcolina e ácido succínico em crianças com diabetes tipo 1 eram muito reduzidos, e verificaram ainda que essas mesmas crianças apresentavam níveis muito elevados de glutamato (Orešic, 2008).

Portanto a análise metabólica aplicada ao estudo da diabetes tipo 1 ou de outras patologias, revela uma vasta informação que pode ajudar tanto no diagnóstico de certas doenças, pelo conhecimento de certas vias metabólicas inerentes à doença, como pode servir na pesquisa de agentes terapêuticos com o intuito de proporcionar novas terapias mais adequadas a cada situação de doença.

1.5 – Objetivos

Este estudo teve como principal objetivo analisar o proteoma e o metaboloma da microbiota intestinal de indivíduos jovens com diabetes tipo 1 em comparação com indivíduos sem diagnóstico da doença (saudáveis). Para isso foi optimizado um protocolo de extração de proteínas e a obtenção dos perfis proteicos em géis de poliacrilamida (2DE) de cada indivíduo presente no estudo, saudável e diabético.

Para a obtenção do perfil metabolómico foi preparada “água fecal” com recurso a água deuterada, para a análise dos metabolitos por NMR, por forma a se obter um perfil metabolómico de cada indivíduo.

A interligação do proteoma com o metaboloma é outro objetivo a alcançar, de modo a verificar a funcionalidade da microbiota intestinal em indivíduos diabéticos em comparação com indivíduos saudáveis.

Capítulo 2 – Material e Métodos

2.1 – Material

2.1.1 – Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente estudo são indicados a seguir:

- ◆ Aparelho de corrente eléctrica do SDS-PAGE: Bio-Rad, Power Pac 300 (EUA)
- ◆ Autoclave Uniclave 88 AJC (Lisboa, Portugal)
- ◆ Balança analítica AE 200, Mettler (EUA)
- ◆ Balança analítica XS-410, Fisher Scientific (Portugal)
- ◆ Banho seco a quente, Multiplaces, Selecta, (Espanha)
- ◆ Câmara de Fluxo Laminar Bio48, Faster (Itália)
- ◆ Câmara de PCR Mini-V/PCR, Telstar (Espanha)
- ◆ Centrífuga Eppendorf centrifuge 5810R (Alemanha)
- ◆ Centrífuga Mikro 22R, Hettich Zentrifugen (Reino Unido)
- ◆ Congelador ultra low temperature freezer -80°C U725, Innova New Brunswick Scientific (EUA)
- ◆ Electrophoresis Power Supply – EPS 301, (EUA)
- ◆ Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System, GE Healthcare (Espanha)
- ◆ ImageScanner III, GE Healthcare (EUA)
- ◆ Incubadora Binder (Alemanha)
- ◆ Leitor de microplacas, Tecan Infinite M200 (Suíça)
- ◆ Medidor de pH GLP21, Crison (Espanha)
- ◆ Microscópio ATC 2000, Leica (Portugal)
- ◆ Placa de aquecimento e agitação, Selecta, Agimatic-E (Espanha)
- ◆ Tina de Electroforese Ettan DALTsix, GE Healthcare (Espanha)
- ◆ Tina do gel de agarose para PCR, Pharmacia Biotech GNA100, (USA)
- ◆ Tina do gel do SDS-PAGE: Bio-Rad Mini Protean IITM (EUA)
- ◆ Thermocycler Biometra (Alemanha)
- ◆ Ultrassons P, Selecta (Espanha)
- ◆ Vórtex L46, Labinco (Holanda)
- ◆ Vórtex PCV-2400, Grant-bio (Reino Unido)

2.1.2 – Soluções

As soluções utilizadas no presente estudo são indicadas a seguir:

- ◆ Solução de NaCl a 0,9% - Sodium chloride, SigmaUltra, minimum 99,5% .
- ◆ Solução de Cloranfenicol (10mg/ml) (Himedia). O antibiótico foi dissolvido em álcool a 96° [Panreac].
- ◆ Tampão de Lavagem, pH 7 (100 mM Tris [Bio-Rad], 100 mM EDTA [Sigma], Protease Inhibitor Mix 100 µl em 100 ml de tampão [Sigma].
- ◆ Tampão de Lise, pH 7 (25 mM Tris [Bio-Rad], 50 mM EDTA [Sigma], 1% DTT [Sigma – Aldrich], Protease Inhibitor Mix [Sigma] (200 µl em 250 ml de tampão)
- ◆ Tampão de Solubilização, pH 3 a 10 (7 M Ureia [Amersham Biosciences], 2 M Tiouréia [Amersham – GE Healthcare], 4% (p/v) CHAPS [USB], 40 mM DTT [Sigma – Aldrich], 0,8% (v/v) Pharmalyte [GE Healthcare])
- ◆ Solução de BSA [USB] (1mg/mL)
- ◆ Tampão da Amostra (SDS-PAGE): 6% (p/v) SDS [GE Healthcare], 6% (v/v) 2 – mercaptoetanol [Bio-Rad], 40% (p/v) sacarose [JT Baker], 0,02% azul de bromofenol [Promega], 0,125 M Tris [Bio-Rad]-HCl [Merck] pH 6,8
- ◆ Tampão de Eléctrodos: Glicina [Sigma], Tris [Bio-Rad], água destilada (250mL).
- ◆ Azul de Coomassie (SDS-PAGE 1 DE): 0,55 g azul de Coomassie [Promega] em 1 L de metanol [Panreac].
- ◆ Solução Descorante (SDS-PAGE 1 DE): 7,5% (v/v) Ácido acético [Merck], 5% (v/v) metanol [Panreac] em água destilada.
- ◆ Tampão de Rehidratação (2D-PAGE): 2 M tioureia [GE Healthcare], 6 M ureia [GE Healthcare], 4% (p/v) CHAPS [USB], 0,002% (p/v) azul de Bromofenol [Merck] em 20 ml água destilada.
- ◆ Tampão de Equilibração (2D-PAGE): 6 M ureia [GE Healthcare], 50 mM Tris [Bio-Rad]-HCl [Merck] pH 8,8, 2% (p/v) SDS [GE Healthcare], 30% (v/v) glicerol [Merck], uns grãos de azul de bromofenol [Promega] em 200 ml de água destilada. Preparam-se alíquotas de 20 ml que se conserva a -20°C. Antes da sua utilização é adicionado DTT [Sigma] (100mg por 10mL) ou Iodoacetamida [Sigma] (400 mg por 10mL).
- ◆ Solução de Agarose selante (2D-PAGE): 25ml Tris-Glicina-SDS, 125 mg de 0,5% agarose [Sigma], uns grãos de azul de bromofenol [Merck] em 25ml água destilada.

- ◆ Solução TGS 10x (2D-PAGE): 250 mM Tris [Bio-Rad], 1,92M glicina [Sigma], 1% SDS [GE Healthcare] em 2 L de água destilada.
- ◆ Solução 10% (p/v) SDS [GE Healthcare].
- ◆ Solução a 10% de persulfato de amónia (PSA) [Merck].
- ◆ Solução do Gel de Acrilamida 12,5 % (p/v): 188 ml acrilamida [Bio-Rad], 113 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 10% (p/v) SDS, 10% (p/v) PSA [Merck], 180 µl TEMED [Stratagene], 140ml água destilada.
- ◆ Solução 0,1 M KCl [Merck].
- ◆ Solução 0,15 M NaOH [Sigma] em D₂O.

2.1.3 – Material Biológico

O material biológico utilizado neste trabalho consiste em amostras fecais recolhidas de 4 indivíduos com Diabetes *mellitus* tipo 1 e de 4 indivíduos sem diagnóstico da patologia (saudáveis).

2.2 – Métodos

2.2.1 – Optimização do protocolo de extração proteica da microbiota intestinal

De modo a otimizar o processo de extração proteica das amostras fecais foi testado o método da lise celular por ação de pérolas de vidro por sonicação descrito por Klaassens *et al.* (2007) e adição de cloranfenicol (100µL/10ml) à solução de lavagem NaCl 0,9% (p/v), de modo a inibir a síntese proteica, de acordo com o descrito por Alpert *et al.* (2009) e Wilmes *et al.* (2004). A duração do período de sonicação em gelo foi testado com intervalos de 15, 20 e 30 minutos. A optimização da quantidade de proteína extraída foi realizada através 1) da precipitação de proteína por adição de acetona (1350µL acetona: 5g de amostra fecal), 2) a adição de acetona e ácido tricarbóxico (1350µL acetona:2g ácido tricarbóxico:5g fezes) e 3) a utilização de tampão ureia-tioureia-CHAPS (±500µL por 5g fezes) segundo descrito por Wilmes *et al.* (2004). As proteínas foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Os géis obtidos encontram-se no Capítulo 7 - ANEXOS.

De acordo com os resultados obtidos o protocolo adotado foi como a seguir se descreve.

2.2.2 – Extração das proteínas da microbiota intestinal

O protocolo utilizado para a extração de proteínas da microbiota intestinal foi uma adaptação dos métodos descritos por Alpert *et al.* (2009), Wilmes *et al.* (2004) e Klaassens *et al.* (2007). Assim, o processo de extração proteica de amostras fecais foi iniciado com a pesagem de 5 g de amostra fecal às quais se adicionou 20 ml de uma solução de 0,9% (p/v) NaCl com 200 μ L de cloranfenicol (100 μ g/ml). As amostras foram homogeneizadas durante 5 min no vórtex, com 5 g de pérolas de vidro de 4 mm (Sigma). Em seguida procedeu-se a um total de onze lavagens do *pellet* obtido

Centrifugou-se 3 vezes a 700g, 1min e 1 vez a 5000rpm, 5min a 4°C. Da primeira para a segunda centrifugação adicionou-se mais 20ml de NaCl a 0,9% e 200 μ L de cloranfenicol. Nas três primeiras centrifugações considerou-se o sobrenadante, na última centrifugação considerou-se o *pellet*.

Colocou-se o *pellet* num eppendorf de 2ml e centrifugou-se 2 vezes a 700g, 1min e 1 vez a 5000rpm, 5min a 4°C. Nas duas primeiras centrifugações considerou-se o sobrenadante e na última centrifugação considerou-se o *pellet*.

O *pellet* obtido foi lavado com tampão de lavagem (100mM Tris, 100Mm EDTA, Protease Inhibitor Mix) (igual volume de pellet 400 μ L) sendo recuperado por centrifugação a 12000 xg, a 4°C durante 5 min.

O *pellet* obtido foi conservado a -80°C e antes da sua utilização foi submetido a mais três lavagens com tampão de lavagem (400 μ L).

Entre lavagens o *pellet* foi sujeito a uma mistura vigorosa durante \pm 30 s. A centrifugação, entre cada lavagem decorreu durante 5 min a 12000 xg e a 4°C. Após as últimas lavagens foi adicionado o tampão de lise (25mM Tris, 50mM EDTA, 1% DTT, Protease Inhibitor Mix) (500 μ L) e esferas de vidro estéreis numa proporção 1:1 (Vesferas:V*pellet*) e procedeu-se ao tratamento das amostras por sonicação durante 15 min em gelo.

Após sonicação foi adicionado 1 μ L de RQ1DNase (Promega) e 4 μ L de RNase (Promega) (10mg/ml) com uma posterior incubação a 4°C durante 30 min. Após este intervalo a solução foi centrifugada a 3000 xg durante 10 min e a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido e a proteína foi precipitada pela adição de acetona gelada [Merck], (2 vezes o volume do sobrenadante) cerca de 675 μ L suplementada com 0,2g de ácido tricarbóxico (TCA) [Merck]. A mistura foi colocada a -20°C durante 1h com uma centrifugação posterior a 18000 xg durante 30 min a 4°C.

O sobrenadante foi eliminado e ao *pellet* obtido foi adicionado um volume de 1350µL de acetona, com o objetivo de eliminar possíveis resíduos de TCA. Após centrifugação a 18000 xg durante 15 min a 4°C o *pellet*, sem vestígios de TCA foi recolhido e seco ao ar muito rapidamente.

A proteína foi solubilizada por adição de 200 µL de tampão de solubilização (7M ureia, 2M tiourea, 4% p/v CHAPS, 40Mm DTT, 0,8% v/v Pharmalyte). O processo de solubilização decorreu por incubação durante 1 h à temperatura ambiente. Terminado este período a solução de proteína foi colocada a -80°C.

2.2.3 - Quantificação das proteínas pelo método de Bradford

Após a extração de proteína, procedeu-se à quantificação da mesma pelo método de Bradford, usando-se para tal o reagente Bio-Rad Protein Assay (1 parte de reagente: 4 partes de água destilada). O valor de absorvência obtido para cada amostra foi posteriormente substituído na recta de calibração, que se obteve a partir de uma solução padrão de BSA, Bovine Serum Albumin [USB] (1mg/ml), para se determinar a quantidade de proteína (µg) presente em 1µl de volume de amostra.

2.2.4 – Extração do DNA da microbiota intestinal

A extração de DNA das amostras fecais foi realizada através do kit QIAmp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN. A quantidade de amostra fecal utilizada na extração de DNA foi de 220 mg. A eluição de DNA das amostras foi feita em 200 µL de tampão AE. As amostras de DNA foram mantidas a -80°C até à sua utilização.

2.2.5 – Electroforese Bi-Dimensional (2-DE)

No presente trabalho utilizou-se a técnica de electroforese bi-dimensional em géis de poliacrilamida para separar as proteínas provenientes da microbiota intestinal de indivíduos com diabetes tipo 1 e de indivíduos saudáveis e assim identificar e caracterizar o proteoma de indivíduos com diabetes tipo 1.

A técnica de separação de proteínas em géis bi-dimensionais de poliacrilamida permite seguir a variação da expressão de, virtualmente, todas as proteínas numa célula ou num tecido. Esta técnica combina a IEF (focagem isoeléctrica) que separa as proteínas de acordo com a sua carga (pI), ou seja, com base no conteúdo de grupos carregados positiva ou

negativamente, e com a PAGE contendo SDS, que separa polipéptidos de acordo com o seu peso molecular (Halpern, 2007).

O gel da focagem isoelectrica é então tratado com SDS e um agente redutor e a seguir colocado no topo de um segundo gel de poliacrilamida saturado com SDS. Quando aplicado um campo eléctrico, as proteínas, separadas de acordo com o seu pI (ponto isoelectrico) no gel de IEF, vão migrar deste para o gel de SDS-PAGE, separando-se de acordo com o seu peso molecular (Halpern, 2007). A seguir faz-se referência a cada passo desta técnica.

2.2.5.1 – Preparação da amostra proteica, rehidratação das tiras e focagem isoelectrica

As proteínas provenientes da microbiota intestinal foram solubilizadas em tampão de solubilização (que continha uréia, tiouréia, CHAPS, DTT e Pharmalyte) e posteriormente foram aplicadas em tiras de gel para se proceder à separação das proteínas com base no seu ponto isoelectrico (1ª dimensão) e no seu peso molecular (2ª dimensão).

Existem vários factores que interferem na carga da proteína, tais como a conformação, composição, existência de grupos prostéticos e pH.

Uma proteína é composta por aminoácidos e cada aminoácido tem vários grupos carregados positiva (NH_3^+) e negativamente (COO^-), estes grupos na molécula vão dar origem a pólos positivos e negativos, o que vai criar um ponto isoelectrico, pI, na proteína.

Esse pI corresponde ao valor de pH para o qual a proteína fica immobilizada na presença de um campo eléctrico.

Os valores do pI das proteínas encontram-se compreendidos entre 3 e 10, tendo como referência a escala de pH (1 a 14), sendo que a maioria das proteínas tem pI inferiores e/ou igual a 7. As proteínas que tem muitos grupos NH_3^+ (resíduo ácido) tem um valor de pI próximo de 3, já as proteínas que tem muitos grupos COO^- (resíduo básico) tem pI próximo de 10 e as proteínas que tem quantidades iguais de NH_3^+ e COO^- tem pI à volta de 7.

Quando se realiza uma electroforese de uma mistura de proteínas e a solução em que se encontra essa mistura possui um gradiente estável de pH, verifica-se que o pH aumenta suavemente do ânodo (+) para o cátodo (-), cada proteína presente na mistura irá migrar para a posição no gradiente de pH correspondente ao seu ponto isoelectrico, pI (Voet & Voet, 2004).

Se uma proteína se difunde para longe da sua posição, a sua carga vai alterar à medida que que ela se move numa região de pH diferente, as forças resultantes do processo de electroforese vão obrigá-la a mover-se de volta para a sua posição isoeléctrica (Voet & Voet, 2004). Portanto cada tipo de proteína é “focada” numa faixa estreita, em torno do seu ponto isoeléctrico, que pode assumir um valor mínimo de 0,01 unidades de pH, sendo este processo designado por focagem isoeléctrica, IEF (Voet & Voet, 2004).

Para as amostras proteicas em estudo escolheram-se as tiras Immobiline Drystrips de 18cm, lineares com intervalo de pH de 4 a 7 (GE Healthcare, Espanha).

O valor do intervalo de pH da tira foi escolhido com base no descrito por Prakash *et al.* (2011). Neste artigo o intervalo de pH é de 6 a 7 para o intestino delgado e de 5 a 7 para o intestino grosso, como tal as proteínas que devem estar presentes na microbiota intestinal devem possuir esta gama de valores de pH, assim o intervalo de pH escolhido foi 4 a 7.

Cada tira comporta até 100µg de proteína e um volume de 340µL. Para tal quantificou-se cada amostra e calculou-se o volume de amostra a aplicar em cada tira. Deste modo foram aplicados os seguintes volumes de extracto proteico de cada amostra por fita, em estudo: 41,15 µL da amostra AC1; 40,98µL da amostra AC4; 55,86µL da amostra AC5; 39,06 µL da amostra AD2; 68,96µL da amostra AD3 e 20,37µL da amostra AD4.

O processo de rehidratação e focagem das fitas foi iniciado com a lavagem e esterilização dos sarcófagos com álcool a 96% e deixou-se secar. Após a lavagem preparou-se as amostras e para tal colocou-se num eppendorf o volume necessário de tampão de rehidratação e de destreak e adicionou-se o volume de amostra proteica e homogenizou-se a solução.

Com a ajuda da micropipeta aplicou-se a amostra ao longo do sarcófago sob a forma de gotas, tendo muito cuidado para não formar bolhas de ar. Após isto colocou-se a tira com o gel virado para a amostra que estava colocada no sarcófago. Ficou assim a rehidratar por 1 hora à temperatura ambiente. Passado este tempo adicionou-se parafina, até encher todo o sarcófago e colocou-se a tampa, com cuidado para não formar bolhas de ar. Colocou-se o sarcófago no IPGphor para fazer a rehidratação durante 11 horas, a 20°C, 30V e 50µA por tira.

Passadas 11 horas substituiu-se a parafina que se encontrava no sarcófago por parafina nova, e durante o processo retirou-se a tira com o gel voltado para cima e após substituição da parafina voltou-se a colocar a tira com o gel voltado para baixo no sarcófago. Colocou-se novamente a tampa com muito cuidado para se evitar a formação de bolhas de ar que possam de alguma forma interferir no processo de focagem da nossa amostra.

Após a rehidratação a baixa voltagem o passo seguinte é a focagem isoelectrica. As condições de focagem isoelectrica utilizadas foram: temperatura de 20°C e 50µA por tira, 100V durante 1 hora step-n-hold, seguindo de 1 hora a 500V step-n-hold, depois ficam 1 hora num gradiente de 8000V e no fim a voltagem utilizada foi de 8000V até 60000V por hora step-n-hold.

No fim da focagem isoelectrica pode-se preparar as tiras para serem utilizadas de imediato ou caso não se utilizem logo podem ser conservadas a -80°C.

2.2.5.2 – Equilibrção das tiras

Terminada a focagem isoelectrica (primeira dimenso) as tiras devem passar por um processo de equilibrção antes de se iniciar o SDS-PAGE (segunda dimenso).

A equilibrção das tiras permite que as proteinas separadas durante a focagem isoelectrica interajam com o SDS. J se observou que proteinas “focadas” ligam-se mais fortemente aos grupos carregados que constituem a matriz do gel da tira e que tempos de equilibrção relativamente prolongados, entre 10 a 15 minutos, tal como a utilizao de ureia e glicerol, presentes no tampao de equilibrção, ajudam a reduzir os efeitos electroendosmoticos, o que favorece a transferencia de proteina da primeira para a segunda dimenso (Görg, 2004).

Por vezes recomendam a utilizao de tiouria para uma transferencia mais eficiente de proteinas hidrofobicas, mas apresenta uma desvantagem, pois pode causar um padrao de estrias verticais no gel resultante do 2D (Görg, 2004).

O processo de equilibrção das tiras e composto por duas etapas, na primeira adicionou-se 1% de DTT (150 mg) [Sigma] a um volume de 15ml de tampao de equilibrção, podem-se colocar até 3 tiras, com o gel virado para cima mas em contacto com a soluao, e permanece assim por 20 minutos.

A utilizao do DTT que e um agente redutor, tem como objectivo quebrar as ligaoes dissulfidricas intra e intermoleculares por forma a conseguir uma completa desnaturao proteica (Görg, 2004).

Na segunda etapa da equilibrção adicionou-se 2,5% de Iodoacetamida (375 mg) [GE Healthcare] a um volume de 15 ml de tampao de equilibrção e colocou-se até 3 tiras, com o gel virado para cima em contacto com a soluao por 20 minutos.

Esta ultima etapa e usada para alquilar qualquer molcula de DTT, pois caso contrario, migraria para o gel de SDS-PAGE (segunda dimenso) e resultaria num fenomeno conhecido

como point-streaking que pode ser observado após a coloração do gel com nitrato de prata. Mas mais importante que este fenómeno, a iodoacetamida tem como objectivo alquilar grupos sulfidrilos e impedir a sua reoxidação (Görg, 2004).

Nas duas etapas do processo de equilibração deve haver uma agitação suave por forma das tiras “incorporarem” as soluções nas quais se encontram. No fim da última etapa retiram-se as tiras da solução de iodoacetamida e colocam-se em 5ml de TGS 1x para se manterem hidratadas até serem colocadas sobre os géis de poliacrilamida, mas só podem permanecer no TGS 1x por 10 minutos.

2.2.6 – Preparação dos géis de poliacrilamida

Para iniciar o SDS-PAGE, preparou-se a solução do gel de poliacrilamida e montou-se a *cassette* onde irá ocorrer a polimerização do gel. Este gel que é utilizado nesta electroforese bi-dimensional permite separar proteínas com diferentes pesos moleculares, após a sua focagem isoelectrica.

A montagem da *cassette* executou-se da seguinte forma: primeiro colocou-se a borracha (em forma de triângulo e preta) no fundo da *cassette*, em seguida colocou-se um plástico fino, que vai ajudar à separação dos vidros após a polimerização do gel, a seguir colocou-se o vidro duplo, outro plástico fino e assim sucessivamente até terminar os vidros duplos e os plásticos finos. Para terminar a montagem da *cassette* colocou-se os plásticos grossos e no sítio onde se irá a colocar a borracha lubrificou-se com Gelseal (GE Healthcare) e colocou-se a borracha por cima. Após tudo preparado, colocou-se a tampa, ajustou-se com as garras e por fim apertaram-se os parafusos de forma a vedar a *cassette*, evitando assim que haja fugas de solução.

Preparou-se a solução de poliacrilamida a 12,5% para um total de 6 géis (6 tiras) perfazendo um volume de aproximadamente 450 ml, como se encontra descrito na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Composição do gel a 12,5%

Reagente	Volume (ml)
30% Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad)	188
1,5 M Tris-HCl a pH 8,8	113
Água destilada	140
10% SDS	4,5
10% PSA	4,5
TEMED concentrado	0,18

Colocou-se a solução na *cassette* e esperou-se que todos os vidros duplos apresentassem a mesma altura de solução. Adicionou-se a cada gel 2 ml de isopropanol a 80%, de forma a exercer um certo peso sobre os géis para que estes fiquem horizontais.

Os géis demoram 1 hora a polimerizar. Uma vez terminada a polimerização, retirou-se os vidros duplos da *cassette* com a ajuda dos plásticos de separação. Os vidros são passados por água para retirar o excesso de acrilamida e são colocados no suporte que posteriormente irá para dentro da tina de electroforese. As tiras são colocadas no topo de cada gel, de forma a que o gel da tira (1ª dimensão) entre em contacto com o gel de poliacrilamida (2ª dimensão). À esquerda da tira, no lado do cátodo colocou-se 5µL num papel de filtro do marcador padrão de proteína All-Blue (Bio-Rad). A tira é selada com uma solução de agarose (Sigma) a 0,5%, aproximadamente 2 ml.

Preencheu-se a tina com um volume de 3,5 L de tampão TGS 1x e colocou-se o suporte com os 6 géis no seu interior. Fechou-se o suporte dos géis com uma câmara-reservatório onde se colocou 1,2 L de tampão TGS 2x. Terminou-se de encher a tina com o restante tampão TGS 1x e por fim fechou-se todo o sistema com a tampa da tina que contém os eléctrodos. As condições de corrida utilizadas encontram-se descritas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Condições de corrida dos géis 2-DE

Passo	mA/gel	Voltagem (V)	w/gel	Tempo (h:m)
1	10	80	1	1:00
2	40	500	13	5:30

Depois de terminada a corrida, retirou-se os géis da *cassette* e foram colocados em tinas com água destilada, com objectivo de se eliminar o excesso de SDS. Após esta lavagem, foram colocados em tinas que continham uma solução de água milliQ, metanol e ácido acético, na proporção de 50:40:10 e assim permaneceram até ao dia seguinte para ser submetidos à coloração com Nitrato de Prata (Sigma).

2.2.7 – Coloração com Nitrato de Prata

O método utilizado para a coloração dos géis 2-DE teve por base o protocolo recomendado pelo EMBL – Proteomics Core Facility para amostras que se destinam à identificação por MALDI-ToF.

- ◆ Solução de Fixação: 50% (v/v) H₂O milliQ, 40% (v/v) metanol [Panreac], 10% (v/v) ácido acético glacial [Merck]

- ◆ Solução de Sensibilização: 0,02% (p/v) Tiosulfato de sódio pentahidratado [BDH Ankar] em água milliQ
- ◆ Solução de Nitrato de Prata: 0,1% (p/v) Nitrato de Prata [Sigma] em água milliQ
- ◆ Solução de Desenvolvimento: 2% (p/v) Carbonato de Sódio [Merck], 0,04% de Formaldeído [Merck] a 37% em H₂O milliQ
- ◆ Solução de Paragem: 5% (v/v) Ácido Acético glacial [Merck] em água milliQ

Para uma eliminação eficaz dos resíduos da solução de fixação, os géis estiveram durante 1h30 em água milliQ. Após este processo de lavagem, foram colocados numa solução de sensibilização por 3min.

Passado este tempo foram lavados duas vezes em água milliQ. Após a última lavagem, os géis foram colocados numa solução de nitrato de prata por 30min. Decorrido este intervalo procedeu-se a duas novas lavagens com água milliQ.

Para se proceder à revelação dos géis adicionou-se uma solução de carbonato de sódio e formaldeído a 37% (v/v) e agitou-se durante 2 a 3 min, até se conseguir observar os pontos proteicos. A partir do momento em que se observou os primeiros pontos proteicos, a revelação processou-se mais rapidamente e neste momento adicionou-se uma solução de ácido acético a 5% (v/v) para parar o processo de revelação. Terminada a reação, os géis foram lavados em água milliQ.

2.2.8 - Digitalização e análise dos géis

O procedimento de digitalização dos géis é iniciado com a calibração do digitalizador Image Scanner II (GE Healthcare). Após a digitalização dos géis procedeu-se à sua análise através do *software* ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

O *software* permite detetar e marcar automaticamente os pontos proteicos, através das funções: editar > spots > detetar. Normalmente esta deteção e marcação inclui não só os pontos proteicos, mas como tudo o que resto que possa aparecer no gel no momento em que é digitalizado, como por exemplo: as bandas do marcador de proteínas e bolhas de ar, que tem de ser eliminadas através das funções, editar > spots > eliminar.

Depois da marcação de todos os pontos proteicos em todas as réplicas de todos os géis, escolheu-se 2 a 3 pontos de referência para se proceder ao emparelhamento dos géis. O emparelhamento dos géis é feito através das funções: seleccionar > géis > match géis.

Após o match feito, procedeu-se à análise estatística, entre cada grupo de estudo e entre os dois grupos. Para se verificarem quais as diferenças que existem em cada grupo aplicou-se o teste de Wilcoxon dado que são utilizados 2 réplicas por gel e um factor em estudo (Diabetes *mellitus* tipo 1).

2.2.9 – Identificação das proteínas

Os pontos proteicos foram sequenciados por LC MS/MS no Core Proteomics Facility da Universidade de Leicester (Reino Unido). Realizou-se a pesquisa de resultados para cada ponto proteico no programa Mascot Database Search – MS/MS Ion Search (Perkins, 1999), tendo em conta os seguintes critérios de pesquisa: enzima Tripsina/P; tolerância do péptido de 0,5 Da; modificação fixa – carbamidometil cisteína; modificação variável – oxidação metionina; até 1 clivagem perdida é permitido e a carga do péptido +1.

2.2.10 – Extração de Metabolitos de amostras fecais

O protocolo utilizado para a extração de metabolitos das amostras fecais foi adaptado do método descrito por Jacobs *et al.* (2008). Pesou-se aproximadamente 100 mg de amostra aos quais se adicionou 200 µL de 0,15M de NaOH [Sigma] em 99% D₂O. Homogeneizou-se a suspensão por agitação no vórtex e colocou-se as amostras em gelo durante 15 min.

A seguir adicionou-se 800 µL de D₂O fria voltando a homogeneizar as amostras por agitação no vórtex, por fim as amostras foram sujeitas a centrifugação a 21912 xg durante 10 min a 15°C. Após a centrifugação transferiu-se o sobrenadante para um tubo Falcon de 15 ml e repetiu-se por mais duas vezes a adição de água deuterada seguida de centrifugação, entre cada uma delas. No final os três volumes de sobrenadante recolhidos foram colocados num mesmo tubo que se conservou a -80°C até à sua utilização.

Para se proceder à identificação do perfil metabolómico foi necessário fazer um tratamento prévio às amostras. Juntou-se 400 µL de amostra com 200 µL de água deuterada e 5µL de TSP em tubos de 5mm, que se colocaram no aparelho de NMR (Varian 600MHz).

A análise metabolómica foi realizada no Laboratório de RMN do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra. Para a análise do perfil metabolómico utilizou-se o *software* MestreNova.

2.2.11 – Medição do pH e do teor de água fecal

Para se efectuar a medição de pH fecal, pesou-se 3g de amostra e colocou-se 7,5ml de uma solução de KCl 0,1M e homogeneizou-se por vórtex.

Após a homogeneização, mediu-se o pH com o eléctrodo e anotou-se o seu valor.

Para determinar o teor de água presente na amostra usou-se um liofilizador. Preparou-se dois eppendorf's com aproximadamente 1g de amostra em cada um deles e pesou-se o seu valor antes de serem colocados a liofilizar (liofilizador gentilmente cedido pelo centro de investigação da UAlg, CCMar).

Quando se verificou que apresentavam um peso constante foram retirados do liofilizador, e ao seu peso anterior à liofilização foi subtraído o peso após a liofilização, a diferença de valores corresponderá ao teor de água presente na amostra em questão.

2.2.12 – Contagem bacteriana total por qPCR em tempo real

Foi necessário quantificar a carga bacteriana presente nas amostras fecais utilizadas na extracção de metabolitos por NMR H¹, e para tal realizou-se um qPCR em tempo real (do inglês, *quantitative real time polymerase chain reaction*). Este procedimento foi realizado pela doutoranda Elsa Pinto Rodrigues do laboratório de Microbiologia, CBME. O primer e a sonda utilizados no qPCR em tempo real estão indicados na tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Primer e sonda utilizados no qPCR em tempo real para quantificação do Total Count

Organismo alvo	Primer / sonda	Sequência (5' - 3')	Tf (°C)	Referência
Total Count (467)	Foward primer	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	62	Nadkarni <i>et al.</i> , 2002
	Reverse primer	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	66	
	Sonda	(6-FAM)-5<<- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3<<- (TAMRA)	69±9	

Os primers e a sonda foram adquiridos a Metabion International AG. (Martinsried, Alemanha). As sondas foram marcadas na extremidade 5' com 6-carboxifluoresceína (FAM)

(fluorocromo "repórter") e na extremidade 3' com "black hole quencher" (BHQ) (fluorocromo "quencher").

As temperaturas para cada primer foram estabelecidas num termociclador de gradiente T (Whatman Biometra, Alemanha). Os produtos de PCR amplificados foram separados num gel de agarose a 2% com Tris-Acetato-EDTA (0,04 M de Tris base, 0,04 M acetato, 0,001 M EDTA, [pH 8,0]), e posteriormente os géis foram corados com SYBR Green (Invitrogen, Reino Unido) e visualizados sob luz ultravioleta.

A especificidade de cada primer e da sonda foi confirmada por PCR em tempo real, utilizando para isso, uma mistura de DNA puro de cada espécie alvo na presença e/ou ausência de DNA puro de diferentes espécies bacterianas (a quantidade de DNA correspondia a 10^4 UFC de cada espécie na mistura).

Para remover os vestígios de DNA de *E. coli*, que podem ser encontrados normalmente no kits da PCR Supermix (Bio-Rad), foi introduzido um passo adicional que incluiu um tratamento da Supermix com DNase Turbo (Ambion, EUA). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação de bactérias totais foi realizada num volume total de 25 μ L contendo: 12,5 μ L de IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, EUA), 1 μ L de cada primer (10 pmol/ μ L), 8 μ L de DNA alvo-purificado e de DNA nuclease livre de água. A amplificação e deteção foram realizadas num termociclador I Cyler IQ (Bio-Rad), sob as seguintes condições: 3 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 20 segundos a 58 °C e 30 segundos a 72 °C. A coleção de fluorescência ocorreu durante a prorrogação por 30 segundos a 72 °C.

Para determinar a especificidade da reação de PCR, a análise da curva de fusão foi feita por aumento lento da temperatura, de 60 °C para 95 °C, com incrementos de 0,5 °C por 10 segundos após a amplificação.

2.2.13 – Inquérito realizado aos jovens adultos saudáveis e diabéticos

Realizou-se um inquérito a cada um dos indivíduos, saudáveis e diabéticos, envolvidos neste estudo. O formato do inquérito encontra-se no capítulo 7 – Anexos, sendo o anexo 1. O inquérito pretende conhecer o estilo de vida, em termos alimentares e clínicos de cada indivíduo.

Capítulo 3 – Resultados

3.1 – Análise dos hábitos alimentares

O inquérito realizado aos diferentes indivíduos, contém questões sobre o tipo de alimentação (regular, vegetariana ou orgânica) que seguem, se consomem probióticos (iogurtes), se praticam desporto e qual, se tomaram antibióticos, entre outras perguntas.

Todos os indivíduos (4 saudáveis e 4 diabéticos) responderam que a progenitora não desenvolveu diabetes gestacional. Dos 8 indivíduos, só dois nasceram de cesariana, tendo os restantes nascido de parto normal.

Em termos de dieta alimentar, todos definiram a sua dieta como sendo regular.

Dos 8 indivíduos, 6 disseram que comem fruta diariamente, enquanto 2 responderam que comem fruta semanalmente. A laranja é a fruta mais consumida por todos os 8 indivíduos, seguindo-se a maçã e a banana consumidas por 6 indivíduos e o kiwi foi a quarta fruta mais consumida por 5 indivíduos.

Todos os 8 indivíduos responderam que consumiam diariamente vegetais, sendo que o tomate e a cenoura são os mais consumidos por todos os indivíduos, seguidos da alface e brócolos que são consumidos por apenas 6 dos 8 indivíduos.

Todos responderam que consomem iogurtes, 4 responderam que consomem diariamente e os outros 4 semanalmente.

Seis dos indivíduos disseram que o seu funcionamento intestinal era diário, enquanto os outros 2 responderam que não era diário.

Nos indivíduos diabéticos inquiriu-se se além da toma de insulina faziam diariamente ou semanalmente algum tipo de medicação, dois dos indivíduos diabéticos responderam que sim.

Nenhum dos indivíduos tomou antibióticos 3 meses antes do estudo. Dos 8 indivíduos em estudo apenas 1 contraiu uma infecção no último ano anterior à colheita de amostra fecal. Apenas 3 dos 8 indivíduos sofrem de alergia, neste caso rinite alérgica. Nenhum dos indivíduos esteve hospitalizado 6 meses antes da colheita de amostra fecal.

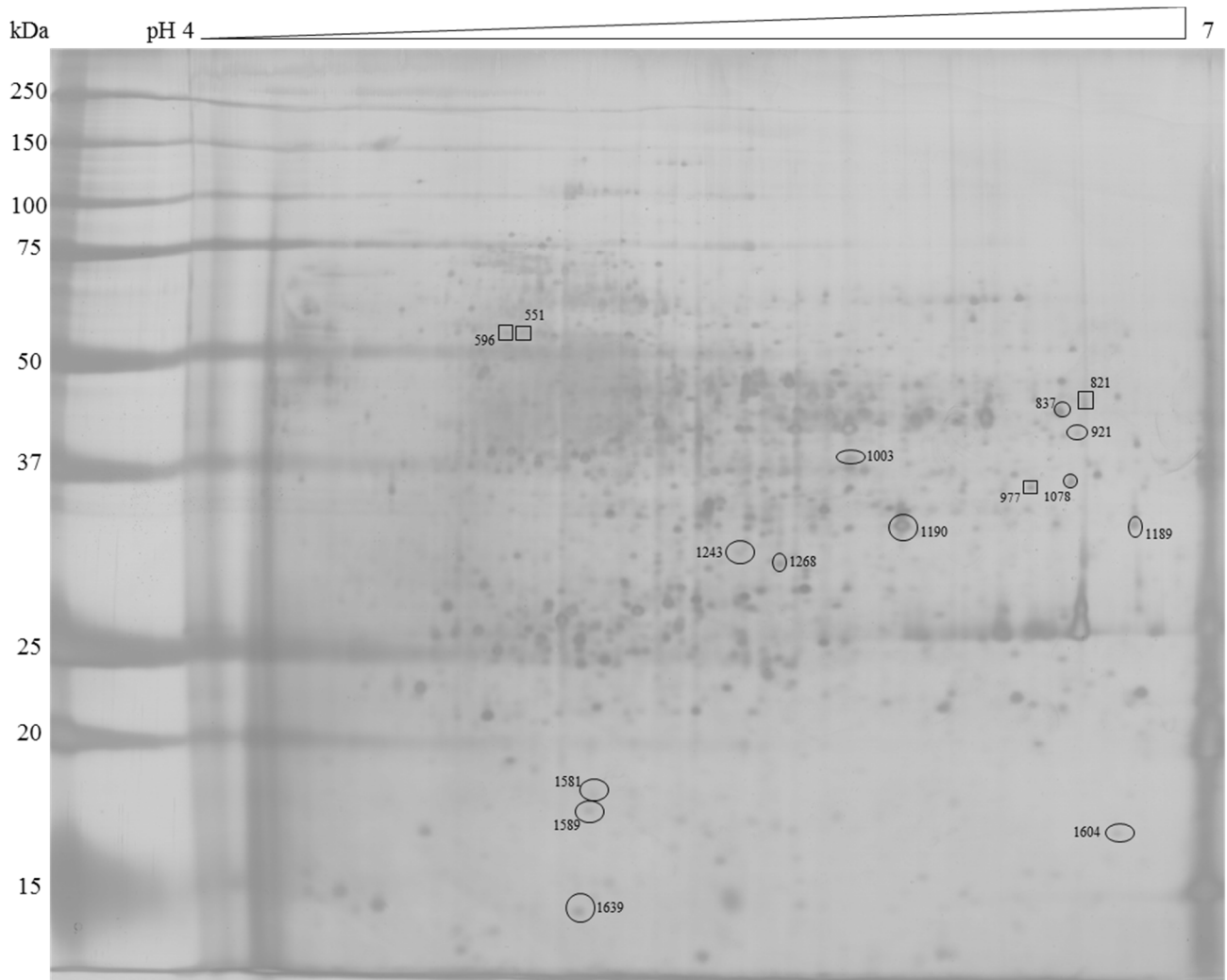
Cinco indivíduos disseram que praticavam desporto (como por exemplo: natação, cardiofitness, bicicleta, futsal) enquanto os restantes não praticam qualquer tipo de actividade desportiva.

3.2 – Contagem bacteriana total

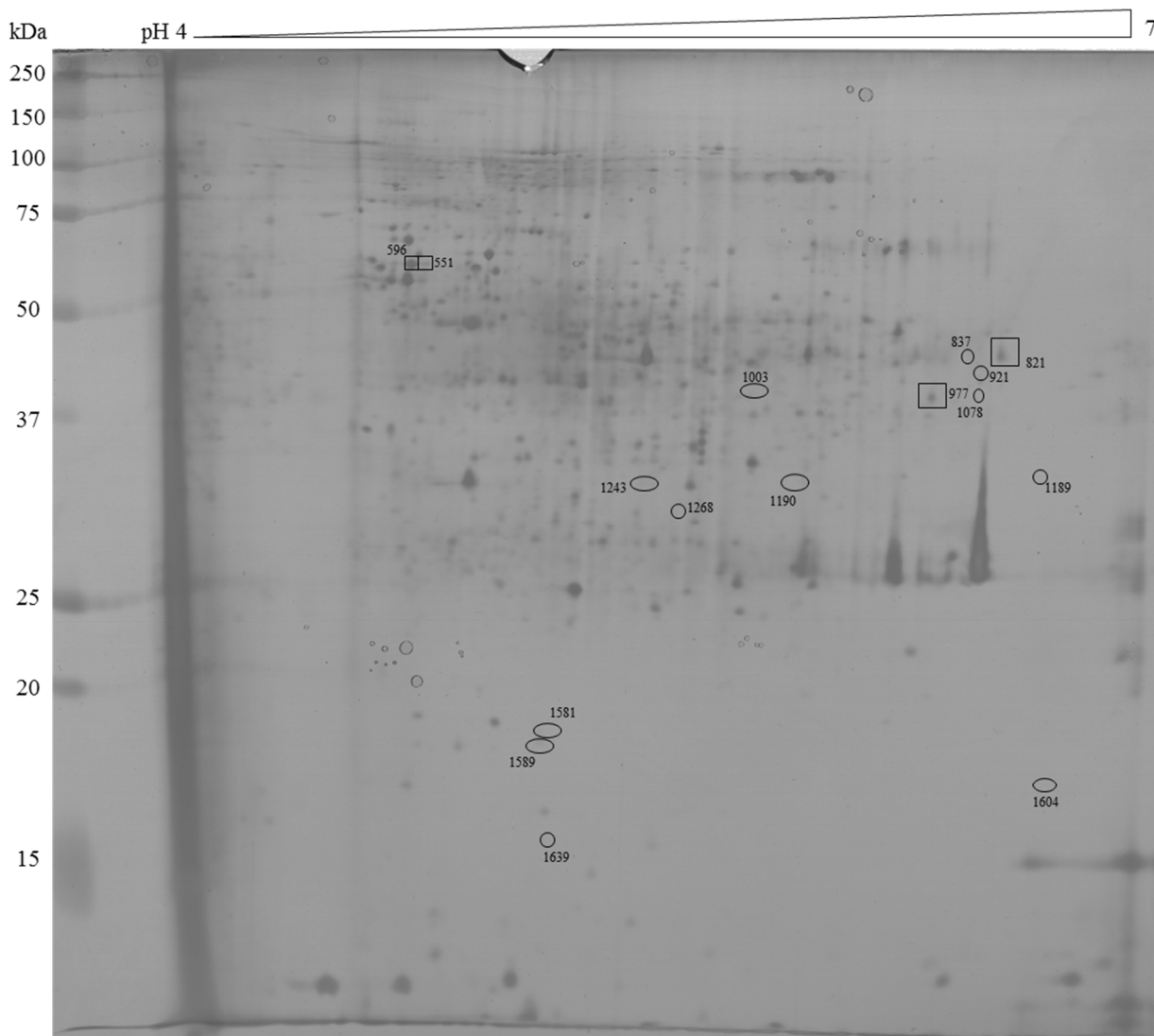
A avaliação da carga bacteriana nas amostras de fezes dos indivíduos em estudo foi avaliada por qPCR em tempo real. A carga bacteriana presente nas fezes foi semelhante para os dois grupos de indivíduos ($P > 0,05$), nomeadamente para o grupo de jovens diabéticos a população bacteriana foi de $11,24 \pm 0,47 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g fezes (peso fresco)}$ e para o grupo controlo foi de $11,20 \pm 0,14 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g fezes (peso fresco)}$. A determinação da carga bacteriana nos indivíduos em estudo é necessária, uma vez que as abordagens posteriores envolvem a avaliação do proteoma e metaboloma da microbiota destes indivíduos cujos resultados poderiam diferir com base numa carga bacteriana diferente entre os grupos.

3.3 – O proteoma da microbiota intestinal

O perfil proteico da microbiota intestinal dos indivíduos diabéticos e saudáveis está representado na Figura 3.1 (A e B). Nos indivíduos diabéticos o número de pontos proteicos detetados foi cerca de 933 e nos indivíduos saudáveis foi cerca de 907. Assim 26 pontos proteicos foram apenas detetados no proteoma da microbiota intestinal dos indivíduos diabéticos e que estavam ausentes no proteoma da microbiota intestinal dos indivíduos saudáveis. Para identificação foram seleccionados 12 pontos proteicos que estavam presentes apenas no proteoma da microbiota intestinal de jovens diabéticos e 4 pontos proteicos que foram mais abundantes ($P < 0,05$) no proteoma da microbiota intestinal de jovens saudáveis. A identificação dos referidos pontos proteicos está indicada na Tabela 3.1.



(A)



(B)

Figura 3.1 – Perfil proteico da microbiota intestinal dos indivíduos diabéticos (A) e saudáveis (B). De cada perfil foram selecionadas as proteínas apenas produzidas pela microbiota de indivíduos diabéticos que estão indicadas por ○ e as proteínas mais abundantes no proteoma de indivíduos saudáveis indicadas por □ .

Tabela 3.1 – Identificação dos pontos proteicos da microbiota intestinal de jovens adultos diabéticos e de jovens saudáveis.

Categoria Funcional	Ponto Proteico ID	NCBI gi	Proteína	Massa Molecular (Da)		Ponto Isoelétrico		Score	Peptide Matching	Cobertura da sequência (%)	Microrganismo
				T	E	T	E				
Proteínas apenas observadas no proteoma da microbiota intestinal de jovens adultos diabéticos											
Metabolismo dos Ácidos Gordos	1189	295101905	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase	31565	35528	6,22	6,69	176	5/11	34	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> L2-6
	1243	21623533	β-hidroxibutiril-CoA desidrogenase	31497	33133	5,33	5,46	88	1/1	5	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
Metabolismo da Glicose	1003	238923894	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, tipo I	38119	43195	5,80	5,80	190	6/14	48	<i>Eubacterium rectale</i> ATCC 33656
Transporte de Nutrientes	1639	253581308	Transportador de Fucose	16576	12647	4,76	4,98	87	2/4	22	<i>Ruminococcus sp.</i> 5_1_39B_FAA
Chaperone	1581	295110702	Peptidil-prolil cis-trans isomerase (rotamase) - família ciclofilina	18935	17435	5,11	5,00	67	3/3	15	<i>Ruminococcus obeum</i> A2-162
Sinalização	1604	21702495	Proteína camada-S	38275	15593	4,97	6,66	44	1/1	4	<i>Clostridium difficile</i>
Transferase (Acetiltransferase)	837	257413075	Acetil-CoA-acetiltransferase	42255	48977	5,96	6,46	154	6/11	31	<i>Roseburia intestinalis</i> L1-82
Metabolismo e Transporte de Aminoácidos	921	451333717	NG, NG - hidrolase dimetilaminodimetilarginina 1	31357	46318	5,09	6,50	33	1/1	3	<i>Amycolatopsis azurea</i> DSM 43854
Função Desconhecida	1078	225376829	Proteína Hipotética ROSEINA2194_02471	35110	40284	6,11	6,48	56	3/7	16	<i>Roseburia inulinivorans</i> DSM 16841
	1190	163815117	Proteína Hipotética COPEUT_01273	31565	36027	5,22	5,98	203	8/20	37	<i>Coprococcus eutactus</i> ATCC 27759
	1268	225025845	Proteína Hipotética EUBHAL_00072	30020	32674	5,38	5,58	126	3/6	15	<i>Eubacterium hallii</i> DSM 3353
	1589	167768442	Proteína Hipotética CLOSS21_03001	20427	16720	5,23	4,99	82	3/6	29	<i>Clostridium sp.</i> SS2/1
Proteínas mais abundantes no proteoma da microbiota intestinal de jovens adultos saudáveis											
Metabolismo da Glicose	977	291515431	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	36659	44258	5,90	6,3	133	4/8	15	<i>Alistipes shahii</i> WAL 8301
Endonuclease	821	291530028	Relaxase / Mobilização Domínio nuclease	54330	49546	9,21	6,5	78	1/1	2	<i>Eubacterium siraeum</i> 70/3

Legenda: T – valor teórico; E – valor experimental.

A categoria funcional e os processos biológicos das proteínas identificadas foram anotados de acordo com as bases de dados consultadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> e <http://www.uniprot.org/>)

Todos os pontos proteicos identificados pertencem a bactérias do trato intestinal (Tabela 3.1). Dos pontos proteicos identificados, os pontos proteicos 1189 e 1243 pertencem à categoria funcional do metabolismo dos ácidos gordos. O ponto proteico 1189 corresponde à proteína 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase da bactéria *Faecalibacterium prausnitzii* L2-6 e o ponto proteico 1243 corresponde a β -hidroxibutiril-CoA desidrogenase da bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*. Seis pontos proteicos ficaram distribuídos por diferentes categorias funcionais, nomeadamente do metabolismo da glicose (ponto 1003), transporte de nutrientes (ponto 1639), *chaperone* (ponto 1581), sinalização (ponto 1604), transferase (ponto 837) e metabolismo e transporte de aminoácidos (ponto 921). É interessante realçar que quatro pontos proteicos têm função desconhecida (pontos 1078, 1190, 1268, 1589).

No grupo de jovens adultos saudáveis, não foi possível identificar dois pontos proteicos (551 e 596) e os outros dois pontos proteicos foram identificados como gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (o ponto proteico 977) e uma endonuclease (o ponto proteico 821). É de salientar que em ambos os grupos foi identificada uma proteína como a mesma função, mas pertencente a bactérias diferentes, o ponto proteico 977 do grupo dos indivíduos saudáveis e o ponto proteico 1003 que correspondem a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. O ponto 1003 que foi apenas expresso nos indivíduos diabéticos e pertence à bactéria intestinal *Eubacterium rectale* e nos indivíduos saudáveis o ponto proteico 977 foi mais abundante e pertence à bactéria intestinal *Alistipes shahii*.

3.4 – Análise metabolômica da microbiota intestinal

3.4.1 – pH e teor de água das amostras analisadas por NMR

O valor de pH, bem como teor de água presente das amostras fecais foi determinado. Os valores estão indicados na Tabela 3.2. O valor de pH das amostras fecais foi semelhante entre os indivíduos diabéticos e saudáveis, apenas a amostra correspondente ao indivíduo diabético AD4 evidenciou um valor de pH mais ácido (5,41). O teor de água das amostras fecais foi semelhante ($P>0,05$) entre os indivíduos diabéticos e saudáveis.

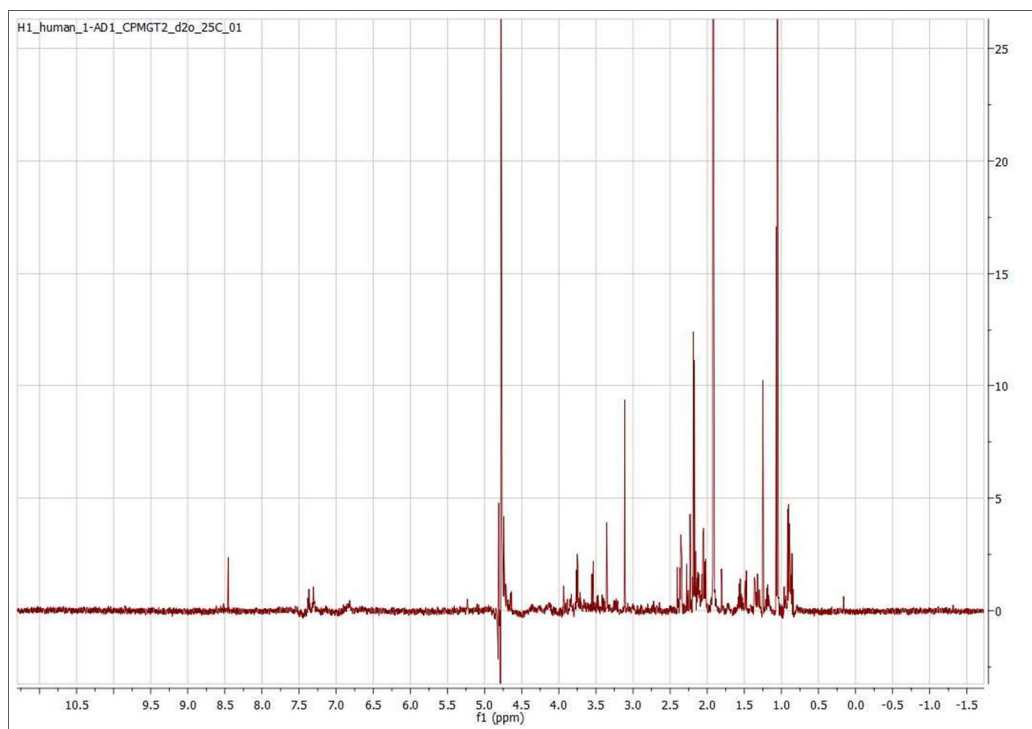
Tabela 3.2 – Valores de pH e teor de água das amostras fecais analisadas

	Adultos	pH	Teor de água (%)
Diabéticos	AD1	6,50	65,36±1,33
	AD2	6,33	70,82±0,07
	AD3	6,56	63,63±0,56
	AD4	5,41	68,50±0,14
Saudáveis	AC1	6,66	62,98±0,68
	AC2	6,75	59,26±0,27
	AC4	6,70	64,55±0,42
	AC5	6,31	67,14±0,28

Os valores de teor de água representam a média de duas réplicas ± desvio padrão.

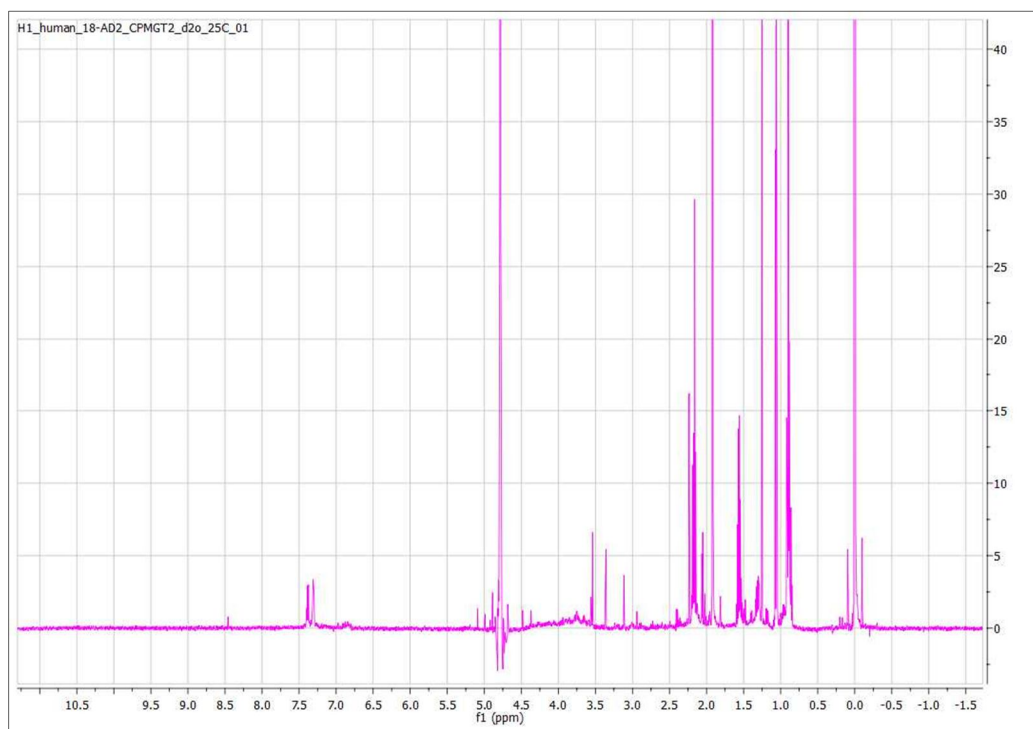
3.4.2 – Perfil metabolómico de cada indivíduo

O perfil metabolómico de cada indivíduo (saudável e diabético) obtido por ^1H NMR está representado na Figura 3.2 (A, B, C, D, E, F, G e H) e a identificação dos metabolitos analisados está indicada na Tabela 3.3.

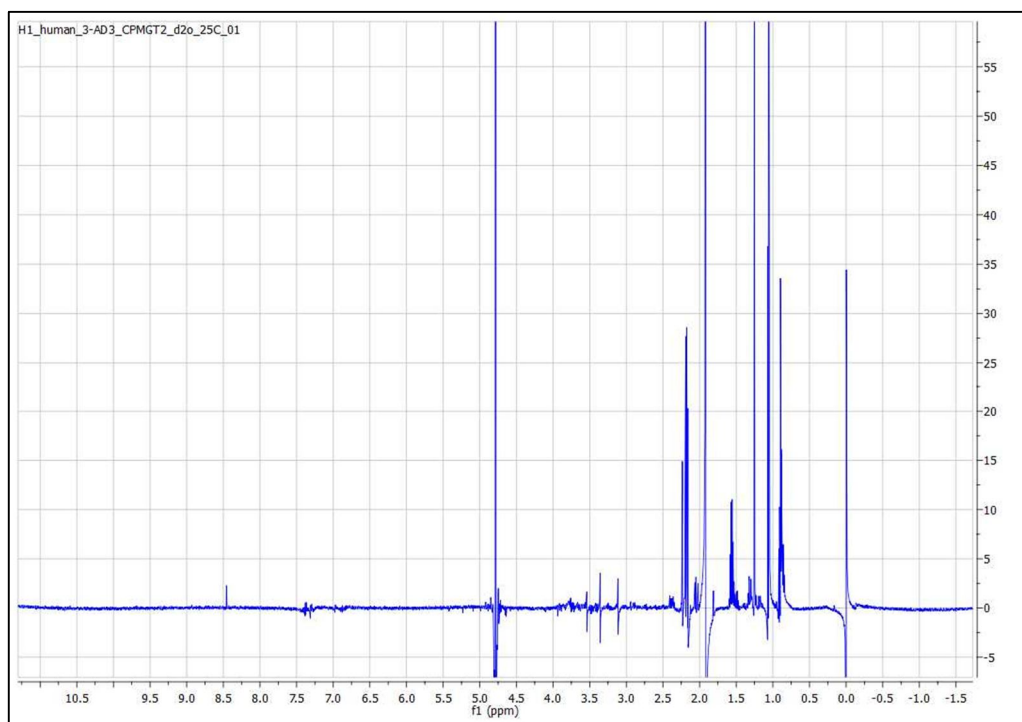


(A)

A microbiota intestinal de doentes jovens com Diabetes *mellitus* tipo 1: uma abordagem proteómica e metabolómica

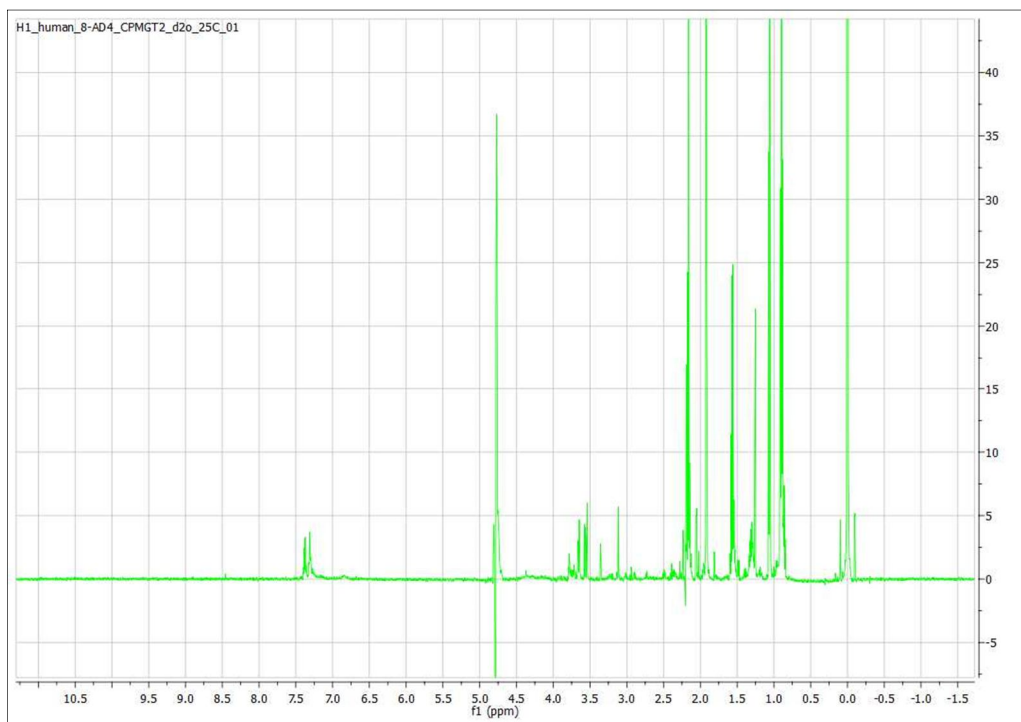


(B)

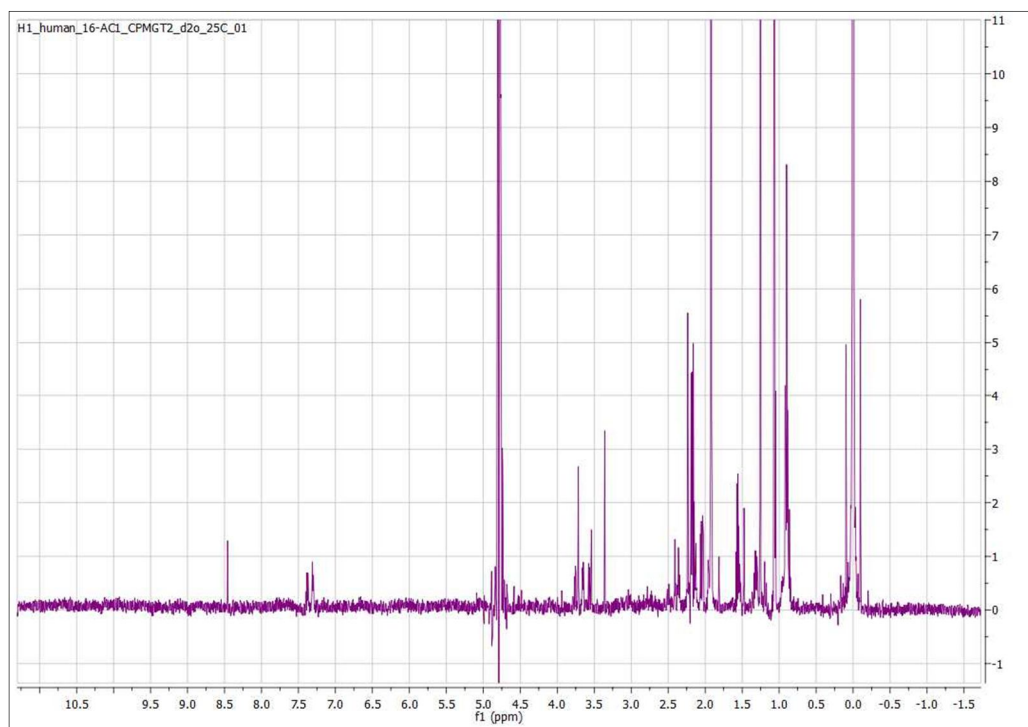


(C)

A microbiota intestinal de doentes jovens com Diabetes *mellitus* tipo 1: uma abordagem proteómica e metabolómica

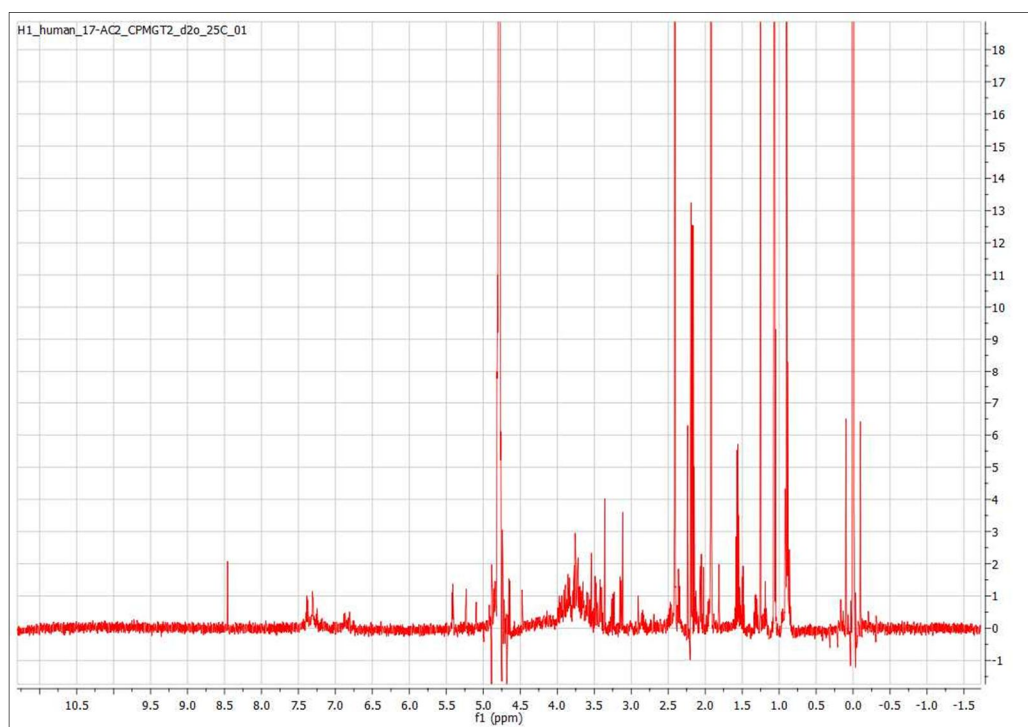


(D)

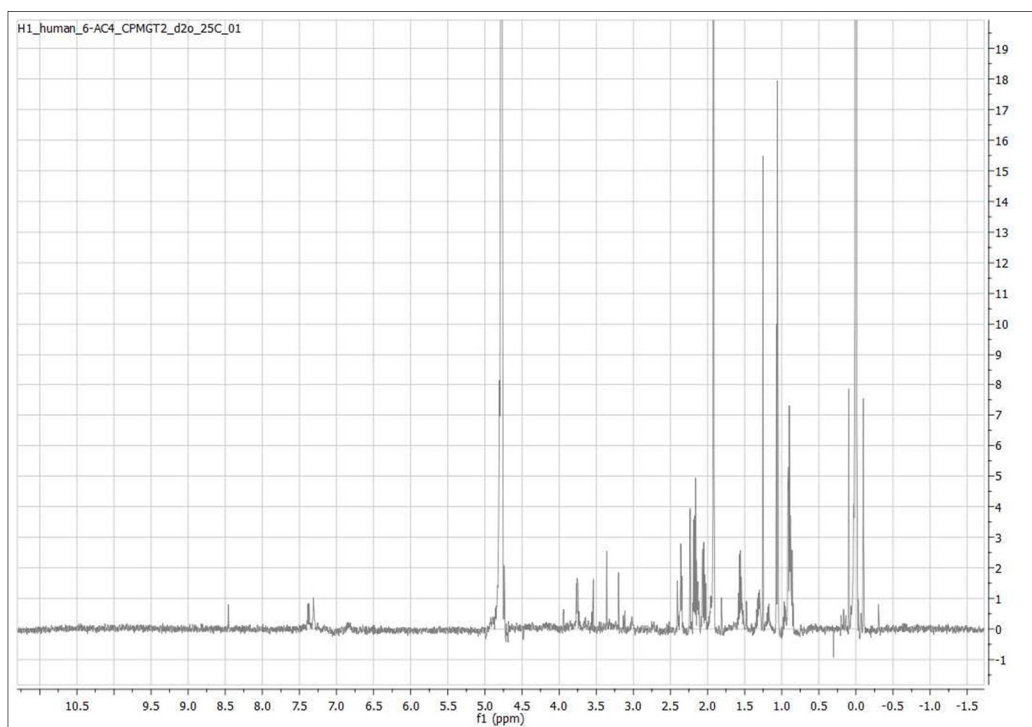


(E)

A microbiota intestinal de doentes jovens com Diabetes *mellitus* tipo 1: uma abordagem proteómica e metabolómica

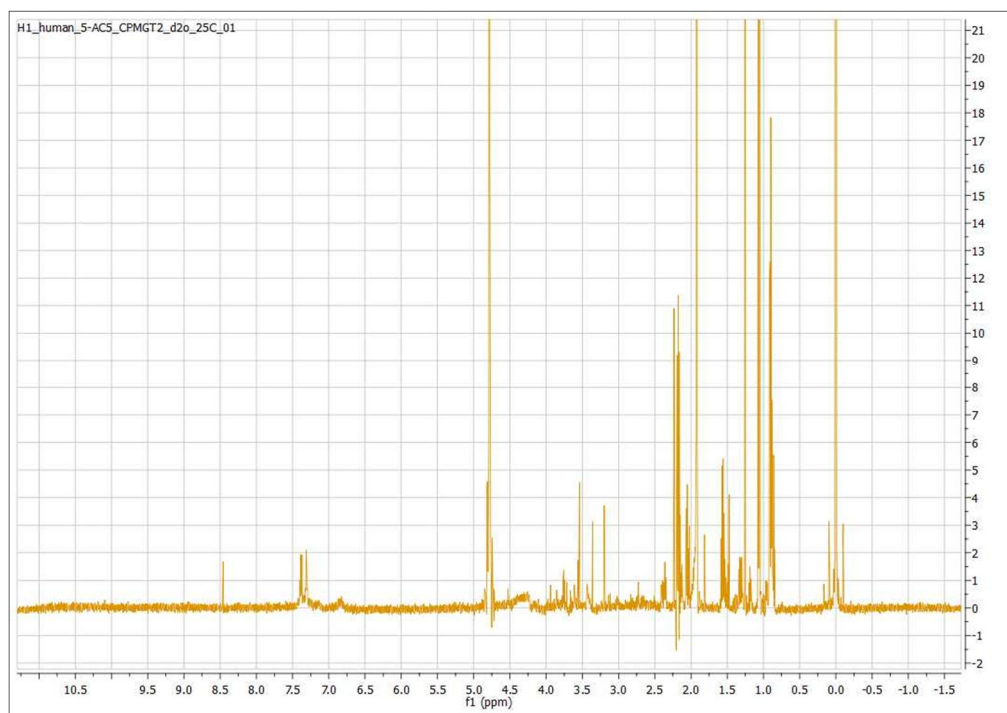


(F)



(G)

A microbiota intestinal de doentes jovens com Diabetes *mellitus* tipo 1: uma abordagem proteómica e metabolómica



(H)

Figura 3.2 – Perfil metabolómico da microbiota intestinal dos indivíduos diabéticos (A, B, C e D) e saudáveis (E, F, G e H).

Tabela 3.3 – Metabolitos presentes nas fezes de quatro indivíduos saudáveis (S) e quatro indivíduos diabéticos (D)

Grupo	Metabolito	Adulto	N	Quantidade* ($\mu\text{mol/g}$)	Sig. ($P < 0,05$)
SCFA (Ácidos gordos de cadeia curta)	Butirato	S	4	1,09±0,89	0,20
		D	3	2,56±1,78	
	Propionato	S	4	2,22±1,86	0,39
		D	3	3,32±0,87	
	Acetato	S	4	4,99±4,33	0,94
		D	3	4,79±0,94	
	Succinato	S	4	0,52±0,94	0,41
		D	3	0,02±0,01	
Formato	S	4	0,15±0,07	0,12	
	D	2	0,04±0,01		
Malonato	S	3	0,08±0,01	0,14	
	D	1	0,05±0,00		
Fenilacetato	S	2	0,02±0,00	0,00	
	D	4	0,00±0,00		
Aminoácido	Glicina	S	2	0,09±0,06	0,00
		D	4	0,00±0,00	
Álcool	Metanol	S	4	0,09±0,02	0,31
		D	3	0,14±0,08	
Cetona	Acetona	S	4	0,11±0,09	0,83
		D	3	0,13±0,06	
Identificação Desconhecida	X	S	4	7,24±6,62	0,34
		D	3	31,34±46,80	
	Y	S	4	0,30±0,24	0,30
		D	3	1,30±1,75	
	B	S	4	0,27±0,26	0,12
		D	3	4,18±5,65	

*Os valores correspondem à média±desvio padrão; N – número de amostra

Através da análise por NMR foi possível identificar 10 metabolitos presentes nas amostras fecais dos grupos em estudo e 3 metabolitos com identificação desconhecida, mas com uma elevada quantidade nos espectros de NMR dos indivíduos diabéticos (Tabela 3.3). No entanto a elevada variação da quantidade destes 3 metabolitos nos indivíduos anula a sua diferença.

Para qualquer dos metabolitos identificados não se detectou diferenças significativas ($P > 0,05$), no entanto é possível verificar que o formato nos indivíduos diabéticos tem tendência a ser menor, do que nos indivíduos saudáveis, facto que também se verifica em crianças diabéticas (estudo em desenvolvimento no laboratório).

Nos indivíduos diabéticos a glicina e o fenilacetato são inexistentes, e a presença de malonato só se verificou para um individuo diabético. O succinato também existe em menor quantidade nos indivíduos diabéticos, enquanto nos indivíduos saudáveis apresenta uma grande variação de valores, o que poderá se dever à funcionalidade da microbiota intestinal existente em cada individuo em estudo.

Os metabolitos desconhecidos, X, Y e B, também apresentaram quantidades com uma grande variação de valores, o que também poderá estar relacionado com a microbiota intestinal. Os restantes metabolitos apresentaram quantidades semelhantes para os dois grupos em estudo ($P>0,05$).

Capítulo 4 – Discussão

Como as cargas bacterianas entre os grupos, saudáveis e diabéticos, e como os hábitos alimentares de cada indivíduo que participou neste estudo são semelhantes, os resultados do proteoma e do metaboloma estarão pois relacionados com diferenças na funcionalidade e não na quantidade da carga bacteriana. Portanto, é de ter em consideração as proteínas identificadas, quer nos indivíduos diabéticos quer nos indivíduos saudáveis, e verificar qual o papel que desempenham, bem como a que género e espécie bacteriana pertencem, em particular a sua associação à microbiota intestinal humana e possível ação no processo de disbiose intestinal com ligação à diabetes *mellitus* tipo 1.

4.1 – O proteoma da microbiota intestinal

Para o grupo de jovens adultos diabéticos foram identificadas 12 proteínas. Duas das proteínas identificadas, como ponto proteico ID 1189 e 1243, participam no metabolismo dos ácidos gordos, e pertencem a bactérias distintas, *Faecalibacterium prausnitzii* L2-6 e *Butyrivibrio fibrisolvens*, respectivamente.

A espécie bacteriana *Faecalibacterium prausnitzii* L2-6 pertence ao filo Firmicutes, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales*, família *Ruminococcaceae*, sendo que a proteína identificada foi a 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase.

Faecalibacterium prausnitzii é uma das três espécies mais abundantes de bactérias encontradas no intestino grosso de um ser humano adulto e saudável (Lopez-Siles, 2012), é uma bactéria gram-positiva, não formadora de esporos e estritamente anaeróbia (Duncan, 2002a). Uma abundância reduzida de *F. prausnitzii* foi relatada em casos de cancro colorectal, o que pode sugerir que esta bactéria possa ser um indicador de uma microbiota intestinal saudável (Lopez-Siles, 2012).

A proteína 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase é uma oxidoreductase que participa no processo metabólico de ácidos gordos, mais concretamente na β -oxidação dos ácidos gordos, mais exactamente participa na 3.^a reacção da β -oxidação dos ácidos gordos (ver Figura 7.5 – Anexo 6) que diz respeito à 2.^a oxidação com a formação de 3-hidroxiacil-CoA. No início da terceira reacção, o enzima $\beta(3)$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase, vai catalisar a transferência de dois átomos de hidrogénio do carbono β para o coenzima NAD^+ , que posteriormente são

incluídos na cadeia respiratória, formando-se assim uma cetona, o β -cetoacil-CoA (Halpern, 2007).

A espécie bacteriana *Butyrivibrio fibrisolvens* pertence ao filo Firmicutes, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales*, família *Lachnospiraceae*. Esta bactéria foi descrita como uma pequena bactéria gram-positiva, particularmente prevalente no sistema digestivo de animais de pasto. Muitas estirpes de *Butyrivibrio* são proteolíticas e estão envolvidas na degradação de fibras (Maia, 2010). O seu habitat preferencial é no intestino grosso (colón e recto), em humanos (Hakansson, 2011).

A proteína beta-hidroxibutiril-CoA desidrogenase em termos biológicos participa no processo metabólico dos ácidos gordos sendo composta por 290 aa. A região da proteína que se localiza entre o aa 1 e o aa 278 está identificada como tendo actividade do enzima 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase. As regiões da proteína compreendidas entre o aa 2 e o aa 180 e entre o aa 182 e o aa 278 estão identificadas como sendo o enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, sendo que a primeira região apresenta um domínio de ligação do NAD e a segunda região apresenta um domínio do C terminal (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

Tal como a proteína anterior, também esta participa na 3.^a reacção do processo de β -oxidação dos ácidos gordos (ver Figura 7.5 – Anexo 6).

A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, tipo I (ponto proteico ID 1003) foi identificada como pertencendo à bactéria *Eubacterium rectale* ATCC 33656. Em termos taxonómicos, a espécie *Eubacterium rectale* pertence ao domínio *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales*, família *Eubacteriaceae*.

As bactérias do género *Eubacterium* são um grupo de bactérias anaeróbias gram-positivas, não formadoras de esporos. O intestino delgado distal humano fornece o ecossistema necessário para uma relação de simbiose e ecogenómica. Membros do género *Eubacterium* são um grupo predominante das bactérias do Filo Firmicutes no intestino humano (The Genome Institute, 2013).

A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma oxidoreductase composta por 352 aa, que em termos biológicos participa no metabolismo da glicose (glicólise) (ver Figura 7.6 – Anexo 6).

Esta proteína apresenta três regiões, estando a primeira compreendida entre o aa 17 e o aa 167, a segunda entre o aa 18 e o aa 343 e a terceira entre o aa 172 e o aa 331. A primeira região apresenta um domínio de ligação ao NAD, a segunda região está identificada como

tendo somente actividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, tipo I e por último a terceira região apresenta um domínio C terminal do enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é um enzima que participa na glicólise, mais em concreto na 6.^a reacção do metabolismo. Neste sexto passo do metabolismo ocorre a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfatoglicerato. A reacção é catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, tendo como cofactor uma molécula de NAD⁺ (Halpern, 2007).

Foi identificada uma proteína que está envolvida no transporte de nutrientes, uma transportadora de fucose (ponto proteico ID 1639) que pertence à bactéria *Ruminococcus* spp. 5_1_39B_FAA. A espécie *Ruminococcus* spp. 5_1_39B_FAA, em termos taxonómicos pertence ao reino *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales*, família *Ruminococcaceae*.

Ruminococcus sp. 5_1_39B_FAA é uma estirpe bacteriana que se caracteriza por ser gram-positiva, anaeróbia e é uma espécie que, regra geral habita no intestino do ser humano. O género *Ruminococcus* é um dos grupos com maior ação celulolítica, pois é fundamental para a degradação da celulose ingerida (Bryant, 1961). Apesar da variedade encontrada na composição da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis foi possível o agrupamento dos indivíduos em dois enterotipos, de acordo com a predominância de determinados géneros de bactérias que por sua vez a sua quantidade é modulada pelo tipo de dieta, ou seja os indivíduos que têm uma alimentação rica em proteína e gorduras animais são agrupados no grupo de *Bacteroides*, enquanto aqueles que têm uma dieta rica em hidratos de carbono são agrupados no enterotipo *Prevotella* e *Ruminococcus* (Arumugam, 2001; Wu, 2011).

A proteína identificada como transportador de fucose (açúcar simples) é uma isomerase constituída por 147 aa. Esta isomerase participa no processo metabólico de monossacarídeos, apresentando actividade isomerase e ligação de monossacarídeos na região entre o aa 1 e o aa 144, região designada por *FucU transport protein family* (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

Sabe-se que os mamíferos absorvem açúcares simples, como a glicose e a galactose, por transporte activo na região proximal do intestino delgado, contudo têm uma capacidade limitada para digerir polissacárideos provenientes da alimentação, cabendo às bactérias aí residentes degradar essas macromoléculas. A fermentação bacteriana dos monossacarídeos

resultantes e os produtos dessa fermentação (ácidos gordos de cadeia curta, SCFA) são posteriormente absorvidos e utilizados pelo hospedeiro humano (Wrong, 1981).

Foi identificada uma proteína que em termos funcionais desempenha um papel de *chaperone* (ponto proteico ID 1581). Esta *chaperone* é produzida por *Ruminococcus obeum* A2-162, sendo designada por Peptidil-prolil cis-trans isomerase (rotamase) que pertence à família ciclofilina.

Ruminococcus obeum A2-162 é uma espécie bacteriana gram-positiva, anaeróbia e é residente do intestino do ser humano saudável (Liu, 2008).

A proteína Peptidil-prolil cis-trans isomerase (rotamase) é composta por 174 aa, tem como funções moleculares a actividade isomerase/rotamase que se caracteriza por acelerar o *folding* das proteínas e por catalisar a isomerização cis-trans nas ligações peptídicas da prolina em oligopéptidos. Esta proteína apresenta dois domínios, estando o primeiro compreendido entre o aa 7 e o aa 161 que apresenta actividade peptidil-prolil cis-trans isomerase B (rotamase B), enquanto o segundo domínio está compreendido entre o aa 9 e o aa 158 e apresenta actividade da ciclofilina-tipo peptidilprolil cis-trans isomerase, também designada por PPIase rotamase (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

A PPIase acelera o *folding* de proteínas, catalisando a isomerização cis-trans das ligações peptídicas que precedem resíduos de prolina. As ciclofilinas são uma família com muita diversidade em termos de funções e têm sido implicadas nos processos de *folding* de proteínas que dependem de actividades catalíticas do tipo *chaperone* (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

O ponto proteico 1604 foi identificado como sendo uma proteína que tem um papel na sinalização molecular, designa-se por proteína da camada S (*S layer protein*), e que é produzida pela bactéria *Clostridium difficile*.

A espécie *C. difficile* em termos taxonómicos pertence ao reino *Bacteria*, filo *Firmicutes*, à classe *Clostridia*, à ordem *Clostridiales* e à família *Peptostreptococcaceae*.

Clostridium difficile é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia, produtora de esporos e de toxinas sendo considerada um agente patogénico do trato gastrointestinal. A infeção por *C. difficile* está ligada ao processo de antibioterapia que provoca uma alteração da microbiota do trato gastrointestinal permitindo o desenvolvimento desta bactéria. A sua transmissão pode estar ligada a casos de inadequada higiene. Indivíduos saudáveis, regra geral não são suscetíveis de contrair a doença (Bartlett & Gerding, 2008).

A proteína da camada S é composta por 359 aa, e corresponde apenas a uma parte da proteína, visto que a proteína total comporta 756 aa. Esta parte da proteína corresponde à região de menor peso molecular da proteína da camada S, que está compreendida entre o aa 11 e o aa 268 (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

As camadas S são proteínas ou glicoproteínas que formam um reticulado que por norma se encontra disposto sobre a superfície externa da bactéria. As camadas S têm demonstrado ser essenciais para a virulência de algumas bactérias patogénicas (Calabi, 2001).

Na maioria das espécies bacterianas, a camada S é composta por uma só proteína de maior peso, que é modificada por glicosilação em algumas espécies (Sara & Sleytr, 2000). No entanto, em *C. difficile*, existem duas proteínas distintas que constituem a camada S (Kawata, 1984; Takeoka, 1991; Cerquetti, 2000). Os pesos moleculares das duas proteínas variam de estirpe para estirpe, mas normalmente a proteína de baixo peso molecular apresenta valores entre 32 e 38 kDa, e a proteína de elevado peso molecular está compreendida entre 42 e 48 kDa, e ambas as proteínas da camada S encontram-se expostas na superfície da célula (Takeoda, 1991). A proteína de baixo peso molecular da camada S apresenta um domínio imunodominante, uma vez que é o antigénio mais reconhecido em casos de diarreia devida a administração de antibióticos (Pantosti, 1989). A proteína de elevado peso molecular parece ser imunologicamente conservada entre espécies, enquanto a proteína de baixo peso molecular parece ser menos conservada (Takeoka, 1991; Cerquetti, 2000).

Estas proteínas de superfície de *C. difficile* parecem mediar a adesão aos tecidos do hospedeiro ou estabelecer interações importantes com o sistema *imunitário* do hospedeiro (Calabi, 2001).

A identificação do ponto proteico ID 837 mostrou tratar-se de uma transferase, mais concretamente uma acetiltransferase que é produzida pela bactéria *Roseburia intestinalis* L1-82. A espécie *Roseburia intestinalis* L1-82 em termos taxonómicos pertence ao reino *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales*, família *Lachnospiraceae*.

Roseburia intestinalis é uma bactéria gram-positiva habitante do intestino humano, apresentam mobilidade, são anaeróbias e não formadoras de esporos, são reconhecidas como produtoras de butirato, lactato e formato utilizando o acetato (Duncan, 2002b).

A proteína identificada, acetil-CoA-acetiltransferase (ID 837) é composta por 399 aa, apresenta duas regiões, a primeira está compreendida entre o aa 9 e o aa 399 e a segunda região está compreendida entre o aa 12 e o aa 399. A primeira região apresenta um domínio que corresponde a uma acetiltransferase putativa de carácter provisório e a segunda região

apresenta um domínio correspondente a uma tiolase (ver Figura 7.5 – Anexo 6), pelo que poderá participar também na β -oxidação dos ácidos gordos. As tiolases são enzimas ubíquas que catalisam a clivagem tiolítica, de carácter reversível, do 3-cetoacil-CoA em acil-CoA e acetil-CoA, em que a reacção de dois passos envolve um intermediário covalente formado a partir de uma cisteína catalítica (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

A proteína que corresponde ao ponto proteico ID 921 está relacionada com o metabolismo e transporte de aminoácidos, a NG, NG – dimetilarginina dimetilamina hidrolase 1 e é produzida pela bactéria *Amycolatopsis azurea* DSM 43854.

A espécie *Amycolatopsis azurea* DSM 43854 em termos taxonómicos pertence ao filo *Actinobacteria*, classe *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales*, família *Pseudonocardineae*.

Amycolatopsis azurea é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia e filamentosa. Esta bactéria é um habitante do solo, mas também pode ser encontrada no intestino humano, tal como o género *Bifidobacterium*, que também pertence ao mesmo filo. O nome da espécie *azure*, significa azul e refere-se à cor do micélio aéreo. Normalmente o micélio é branco, mas num meio de cultura com sacarose, nitrato, tirosina e agar fica azul e num meio de cultura com glicose, peptona e agar fica rosa (Henssen, 1987).

NG, NG – dimetilarginina dimetilamina hidrolase 1 é composta por 281 aa e apresenta duas regiões com actividades distintas. A primeira região situa-se entre o aa 12 e o aa 279 e corresponde à hidrolase (N-Dimetilarginina dimetilamino hidrolase) que desempenha um papel no transporte e metabolismo de aminoácidos, a segunda região situa-se entre o aa 18 e o aa 279 e corresponde a uma amidinotransferase, que catalisa a reacção: arginina + H₂O → citrulina + NH₃ (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

Quatro pontos proteicos (ID 1078, 1190, 1268 e 1589) não têm atribuída qualquer função. O ponto proteico 1078, corresponde à proteína hipotética ROSEINA2194_02471 que pertence à bactéria *Roseburia inulinivorans* DSM 16841.

Roseburia inulinivorans é uma bactéria que se caracteriza por ter uma reacção variável à coloração de Gram, apresenta mobilidade, é estritamente anaeróbia, catalase negativa e habita o intestino do ser humano (Duncan, 2006).

A proteína hipotética ROSEINA2194_02471 é composta por 324 aa e possui um domínio, entre o aa 5 e o aa 324 que aparenta ter actividade 6-fosfofrutoquinase, o que nos sugere que esta proteína poderá participar no metabolismo da glicose, mais concretamente na 3.^a reacção do metabolismo (ver Figura 7.6 – Anexo 6).

O ponto proteico 1190, corresponde à proteína hipotética COPEUT_01273 que pertence à bactéria *Coprococcus eutactus* ATCC 27759.

Em termos taxonómicos a espécie *Coprococcus eutactus* pertence ao reino *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales* e família *Lachnospiraceae*.

A bactéria *Coprococcus eutactus* é gram-positiva, estritamente anaeróbia, ocorrem geralmente aos pares e não apresentam mobilidade, sendo o seu habitat preferencial o intestino grosso do ser humano (Holdeman, 1974).

A proteína hipotética COPEUT_01273 é composta por 290 aa e possui uma região que apresenta dois domínios distintos. A região que se encontra entre o aa 1 e o aa 278 corresponde ao enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, sendo que o primeiro domínio situa-se entre o aa 2 e o aa 180 e corresponde ao enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase que estabelece ligação ao NAD, enquanto o segundo domínio situa-se entre o aa 182 e o aa 278 e corresponde ao mesmo enzima, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase que apresenta um domínio C terminal (Conserved Domains and Protein Classification, 2013). Esta proteína hipotética parece também ela desempenhar um papel no metabolismo dos ácidos gordos, mais concretamente na β -oxidação dos ácidos gordos (ver Figura 7.5 – Anexo 6).

O ponto proteico 1268, corresponde à proteína hipotética EUBHAL_00072 que pertence à bactéria *Eubacterium hallii* DSM 3353.

Eubacterium hallii é uma bactéria gram-positiva, estritamente anaeróbia, são bacilos sem mobilidade que podem aparecer aos pares, sozinhos e ocasionalmente em cadeia, e também habita no intestino do ser humano (Holdeman, 1974).

A proteína hipotética EUBHAL_00072 é composta por 279 aa e possui três regiões distintas. A primeira região situa-se entre o aa 1 e o aa 277 e corresponde ao enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase; a segunda região situa-se entre o aa 6 e o aa 52 e corresponde ao enzima metil-transferase dependente de S-adenosil-metionina, classe 1, são enzimas que utilizam S-adenil-L-metionina como substrato para a transferência de um grupo metilo, criando o produto S-adenosil-L-homocisteína; a terceira região situa-se entre o aa 181 e o aa 277 e corresponde ao enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase com domínio C terminal (Conserved Domains and Protein Classification, 2013). Também esta proteína hipotética parece desempenhar um papel no metabolismo dos ácidos gordos, no processo da β -oxidação (ver Figura 7.5 – Anexo 6).

O ponto proteico 1589, corresponde à proteína hipotética CLOSS21_03001 que pertence à bactéria *Clostridium* spp. SS2/1.

Clostridium sp. é uma bactéria gram-positiva, estritamente anaeróbia, tem a forma de bastonete, produz endósporos e pode viver no solo, na água e no trato gastrointestinal do ser humano e de diversos animais (Ryan, 2004).

A proteína hipotética CLOSS21_03001 é composta por 181 aa e apresenta quatro regiões distintas. A primeira região situa-se entre o aa 2 e o aa 34 e corresponde a uma rubredoxina_SM; que é um pequeno módulo não hémico que tem um domínio de ligação ao ferro, que contém um centro de $[Fe(SCis)_4]$ presente na rubreritrina e na nigeritrina, e tem a capacidade de detetar quer o terminal C quer o terminal N de proteínas tipo a redutase flavina, a redutase NAD(P)H-nitrito e a redutase ferredoxina-tioredoxina; na rubredoxina o átomo de ferro é coordenado por quatro resíduos de cisteína ($Fe(S-Cis)_4$) e acredita-se que possa estar envolvida na transferência de electrões (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

A segunda região situa-se entre o aa 3 e o aa 32 e corresponde à rubredoxina. A terceira região situa-se entre o aa 57 e o aa 180 e corresponde a uma molécula tipo rubreritrina que tem domínio de ligação a dois ferros. A quarta região situa-se entre o aa 62 e o aa 181 e corresponde à rubreritrina que parece desempenhar um papel na conversão e produção de energia (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

Herrero *et al*, verificaram que numa situação clínica de diabetes *mellitus* tipo 1, ocorre um aumento da utilização de ácidos gordos e um aumento da oxidação de ácidos gordos pelo miocárdio em detrimento da utilização da glucose. Os resultados dos vários estudos em modelos animais para a diabetes *mellitus*, demonstraram que o substrato preferencial do miocárdio (glucose) é posto de parte, a partir do momento em que o coração se torna exclusivamente dependente do metabolismo dos ácidos gordos (Belke, 2000; Lopaschuk, 1989; Randle, 1964). Nos modelos animais e também em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1, verificou-se que a utilização de ácidos gordos no miocárdio e oxidação dos ácidos gordos no miocárdio aumentaram (Herrero, 2006).

O que nos leva a concluir que uma vez, que os níveis de glucose estão controlados devido à acção da insulina, os ácidos gordos serão a fonte de energia mais acessível para os vários metabolismos e órgãos do indivíduo diabético.

Sabe-se que as bactérias comensais, ou seja, do trato gastrointestinal especializaram-se em complexos enzimáticos de hidrólise e em transportadores, de modo a digerir nutrientes tão complexos como os polissacarídeos, algo impossível para o intestino do ser humano realizar. Os polissacarídeos são as principais fontes de energia para as bactérias que colonizam o

intestino grosso, o que de certa forma lhes confere uma vantagem competitiva sobre as bactérias transitórias. Sabe-se ainda que a fermentação microbiana de compostos alimentares não digeridos pode fornecer aproximadamente 10% da energia necessária por dia para omnívoros e até 70% no caso de herbívoros (Flint, 2008).

A degradação da matriz e de outros polissacarídeos alimentares (como pectinas, amido e inulina), assim como as mucinas do próprio hospedeiro levam à síntese de produtos intermédios (como succinato, lactato, etc) e finalmente aos ácidos gordos de cadeia curta (como acetato, butirato, propionato, etc), que uma vez sintetizados são quase completamente absorvidos ao longo do trato gastrointestinal (Sanz, 2008).

A razão porque, as proteínas identificadas apenas foram observadas nos indivíduos diabéticos é desconhecida, mas indicam um funcionamento da microbiota diferente dos indivíduos saudáveis.

No grupo de jovens adultos saudáveis foram identificadas duas proteínas, a primeira ligada ao metabolismo da glicose e a segunda é uma endonuclease.

A proteína relacionada com o metabolismo da glicose foi a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (ponto proteico ID 977) e pertence à bactéria *Alistipes shahii* WAL 8301.

A bactéria *Alistipes shahii* em termos taxonómicos pertence ao Filo *Bacteroidetes*, classe *Bacteroidia*, ordem *Bacteroidales* e família *Rikenellaceae*.

Alistipes shahii é uma estirpe bacteriana gram-negativa e estritamente anaeróbia. É resistente a 20% de bÍlis num meio de cultura, é ainda indol positiva e catalase negativa, sendo o intestino humano o seu habitat mais provável (Song, 2006). É interessante realçar que ratinhos submetidos à eliminação do gene MyD88 (codifica a pirina) estão protegidos do desenvolvimento da diabetes tipo 1 e apresentam maiores quantidades de várias bactérias, entre elas, bactérias da família *Rikenellaceae* (Wen, 2008).

A segunda proteína identificada foi uma endonuclease designada por Relaxase/Mobilização (domínio nuclease) produzida pela bactéria *Eubacterium siraeum* 70/3.

A bactéria *E. siraeum* pertence ao Filo *Firmicutes*, classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales* e família *Eubacteriaceae*.

Como referido anteriormente *Eubacterium* spp. é uma bactéria gram-positiva, estritamente anaeróbia cujo habitat é o intestino do ser humano.

A endonuclease produzida por *E. siraeum* é composta por 460 aa e apresenta uma só região, que se situa entre o aa 36 e o aa 272 e corresponde à proteína de nome Relaxase, mas possui um domínio de uma nuclease relaxase/mobilização. As proteínas de

mobilização/relaxases são necessárias para a transferência horizontal de informação genética contida em plasmídeos que ocorre durante a conjugação bacteriana. A relaxase em conjunto com várias proteínas auxiliares, forma um complexo de relaxamento ou relaxossoma. As relaxases fazem uma dupla incisão no DNA e assim catalisam a trans-esterificação de electrões (Conserved Domains and Protein Classification, 2013).

4.2 – Análise metabolómica da microbiota intestinal

Os metabolitos identificados por ^1H NMR da microbiota intestinal, englobam vários grupos funcionais, como ácidos gordos de cadeia curta (SCFA), aminoácido, álcool, cetona e ainda se encontrou três metabolitos aos quais não se conseguiu atribuir uma funcionalidade.

Em termos de quantidades médias de SCFA produzidos pela microbiota intestinal, não se verificou diferenças significativas entre os grupos. Foi registada uma variação significativa ($P < 0,05$) na produção de SCFA em cada um dos grupos pelo que a análise requer um maior número de indivíduos para confirmarmos se existe alguma diferença significativa, em particular na produção de formato, que em crianças diabéticas foi detetada uma menor concentração (Pinto, 2013). Deste modo não podemos afirmar que a microbiota intestinal de jovens diabéticos tem uma funcionalidade diferente.

Capítulo 5 – Considerações finais e Perspetivas Futuras

5.1 – Considerações finais

O presente estudo foi dirigido para a análise da microbiota intestinal de jovens diabéticos em comparação com jovens sem diagnóstico da doença. Pretendeu-se avaliar a funcionalidade da microbiota através de uma abordagem proteómica e metabolómica.

A análise da microbiota intestinal permitiu-nos verificar que a carga bacteriana total dos indivíduos diabéticos foi semelhante aos indivíduos saudáveis.

O proteoma da microbiota intestinal dos indivíduos diabéticos revelou a presença de pontos proteicos que estavam ausentes nos indivíduos saudáveis. Os pontos proteicos identificados corresponderam a enzimas que participam no metabolismo dos ácidos gordos, hidratos de carbono e metabolismo e transporte de aminoácidos. Todos os pontos proteicos identificados pertenciam a bactérias cujo habitat é o intestino humano. No entanto é importante salientar que quatro pontos proteicos corresponderam a proteínas cuja função é desconhecida.

A análise metabolómica por NMR H^1 mostrou que não existem diferenças significativas dos metabolitos identificados nos grupos em estudo. Contudo foi registada uma variação significativa em alguns metabolitos, entre os quais o butirato e formato. Foram ainda assinalados três metabolitos em maior concentração nos indivíduos diabéticos, mas cuja identificação não foi possível obter. Os três metabolitos apresentaram uma variação muito significativa entre os indivíduos. É possível que a sua produção esteja associada às proteínas cuja função é desconhecida.

Todos os indivíduos que participaram neste estudo responderam a um inquérito sobre os seus hábitos alimentares. A análise dos inquéritos não revelou diferenças nos hábitos alimentares dos indivíduos em estudo.

Quer a análise proteómica quer a análise metabolómica apontam para diferenças na funcionalidade da microbiota de indivíduos diabéticos, contudo existe uma variação significativa entre eles o que limita a sua extrapolação.

5.2 – Perspetivas Futuras

Uma vez que uma pequena parte das proteínas expressas pela microbiota intestinal foram identificadas é recomendável uma identificação mais completa, bem como outras abordagens como a técnica de *shotgun* através da qual se pode detetar e identificar proteínas presentes numa mistura complexa, sem que haja necessidade de proceder à sua separação num gel de acrilamida.

Como foram identificadas proteínas cuja função é desconhecida seria útil verificar o seu papel e estabelecer a sua provável ligação com a produção dos metabolitos sem identificação.

Capítulo 6 – Bibliografia

- Alpert C, Scheel J, Engst W, Loh G and Blaut M (2009). Adaptation of protein expression by *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice. *Environmental Microbiology* 11, 751 – 761
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR *et al.* (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174 – 180
- Bain JR, Stevens RD, Wenner BR, Ilkayeva O, Muoio DM and Newgard CB (2009). Metabolomics applied to diabetes research – moving from information to knowledge. *Perspectives in Diabetes – Diabetes Journal* 58, 2429 – 2443
- Balaban RS (2010). The Mitochondrial Proteome: A dynamic functional program in tissues and disease states. *Environ Mol Mutagen* 51, 352 – 359
- Banco da Saúde (2008). Acedido em Ago. 7, 2012, disponível em: www.bancodesaude.com.br/diabetes
- Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ *et al.* (2000). Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *The Lancet* 356, 1749 – 1756
- Barker JM. (2006). Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91, 1210 – 1217
- Bartlett JG and Gerding DN (2008). Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 46 (Suppl 1), S12 – S18
- Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL (2000). Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol* 279, E1104 – 1113.
- Boavida JM, Fragoso de Almeida JP, Massano Cardoso S, Sequeira Duarte J, Duarte R, Ferreira H *et al.* (2012). Diabetes: Factos e Números 2011 - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes. *Sociedade Portuguesa de Diabetologia*, 10 – 14
- Boerner BP and Sarvetnick NE (2011). Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1243, 103 – 118
- Burg D, Ng C, Ting L and Cavicchioli R (2011). Proteomics of extremophiles. *Environmental Microbiology* 13, 1934 – 1955
- Brugnara L, Vinaixa M, Murillo S, Samino S, Rodriguez MA, Beltran A *et al.* (2012). Metabolomics approach for analysing the effects of exercise in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Plos One* 7, 1 – 8

- Bryant MP and Robinson IM (1961). Some Nutritional Requeriments of the Genus *Ruminococcus*. 1 – 5
- Calabi E, Ward S, Wren B, Paxton T, Panico M, Morris H *et al.* (2001). Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Molecular Microbiology* 40, 1187 – 1199
- Cerquetti M, Molinari A, Sebastianelli A, Diociaiuti M, Petruzzelli R, Capo C *et al.* (2000) Characterization of surfasse layer proteins from diferente *Clostridium difficile* clinical isolates. *Microb Pathog* 28, 363 – 372
- Conserved Domains and Protein Classification (2013). Acedido em Abril, 2013, disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml
- Craig ME, Hattersley A and Donaghue KC (2009). Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes* 10, 3 – 12
- Dallas J (2011). Royal College of Physicians of Edinburgh. Diabetes, Doctors and Dogs: An exhibition on Diabetes and Endocrinology by the College Library for the 43rd St. Andrew's Day Festival Symposium
- Dobson M. (1776). Nature of the urine in diabetes. *Medical Observations and Inquiries* 5, 298 – 310
- Dumas ME, Wilder SP, Bihoreau MT, Barton RH, Fearnside JF, Argoud K *et al.* (2007). Direct quantitative trait locus mapping of mammalian metabolic phenotypes in diabetic and normoglycemic rat models. *Nature Genetics* 39, 666 – 672
- Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Harmsen HJM and Flint HJ (2002a). Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2141 – 2146
- Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS and Flint HJ (2002b). *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1615 – 1620
- Duncan SH, Aminov RI, Scott KP, Louis P, Stanton TB and Flint HJ (2006). Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2437 – 2441
- Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R and Griffin JL (2011). Critical Review – Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of The Royal Society of Chemistry* 40, 387 – 426

- Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R and White BA (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology* 6, 121–131.
- Geerlings SE and Hoepelman A (1999). Immune dysfunction in patients with diabetes *mellitus* (DM). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 26, 259 – 265
- Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT and de Vos W (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr* 6, 209 – 240
- Giongo A, Gano K, Crabb D, Mukherjee N, Novelo L, Casella G *et al.* (2011). Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The ISME Journal* 5; 82 – 91
- Görg A, Weiss W and Dunn MJ (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics Journal* 4, 3665 – 3685
- Griffin JL and Vidal-Puig A (2008). Current challenges in metabolomics for diabetes research: a vital functional genomic tool or just a ploy for gaining funding?. *Physiol Genomics* 34, 1 – 5
- Hakansson A and Molin G (2011). Gut microbiota and inflammation. *Nutrients* 3, 637 – 682
- Halpern MJ, Quintas A e Ponces Freire A (2007). *Bioquímica, Organização Molecular da Vida*, 1ª ed. (Lidel, Lisboa)
- Harris K, Kassis A, Major G and Chou CJ (2012). Is the Gut Microbiota a New Factor Contributing to Obesity and Its Metabolic Disorders?. *Journal of Obesity* 2012, 1 – 14
- Hattori M and Taylor TD (2009). The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. *DNA Research* 16, 1 – 12
- Henssen A, Kothe HW and Kroppenstedt RM (1987). Transfer of *Pseudonocardia azurea* and “*Pseudonocardia fastidiosa*” to the Genus *Amycolatopsis*, with Emended Species Description. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 292 – 295
- Herrero P, Peterson LR, McGill JB, Matthew S, Lesniak D, Dence C *et al.*, (2006). Increased Myocardial Fatty Acid Metabolism in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of the American College of Cardiology* 47, 598 – 604.
- Hill DA and Artis D (2010). Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 623 – 667
- Himsworth HP (1936). Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *The Lancet* 227, 127 – 130
- Holdeman LW and Moore WEC (1974). New Genus, *Coproccoccus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24, 260 – 277

- Idle J and Gonzalez FJ (2007). Metabolomics. *Cell Metab* 6, 348 – 351
- Jacobs D, Deltimple N, van Velzen E, van Dorsten F, Bingham M, Vaughan E *et al.* (2008). ¹H NMR metabolite profiling of feces as a tool to assess the impact of nutrition on the human microbiome. *NMR in Biomedicine* 21, 615 – 626
- Kawata T, Takeoka A, Takumi M and Masuda K (1984). Demonstration and preliminary characterization of a regular array in the cell wall of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 24, 323 – 328
- Klaassens ES, de Vos WM and Vaughan EE (2007). Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1388 – 1392
- Klein JB and Thongboonkerd V (2004). Overview of Proteomics. *Proteomics in Nephrology* 141, 1 – 10
- Knip M (2009). Diet, gut, and type 1 diabetes: role of wheat-derived peptides?. *Diabetes* 58, 1723 – 1724
- Kosiewicz M, Zirnheld A and Alard P (2011). Gut microbiota, immunity and disease: a complex relationship. *Frontiers in Microbiology* 2, 1 – 11
- Lee MS (2011). Role of innate immunity in Diabetes and Metabolism: recent progress in the study of inflammasomes. *Journal Immune Network* 11, 95 – 99
- Liu C, Finegold SM, Song Y and Lawson PA (2008). Reclassification of *Clostridium coccooides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccooides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1896 – 1902
- Lopaschuk GD and Spafford M (1989). Response of isolated working hearts to fatty acids and carnitine palmitoyltransferase 1 inhibition during reduction of coronary flow in acutely and chronically diabetic rats. *Circ Res* 65, 378 – 387.
- Lopez-Siles M, Khan TM, Duncan SH, Harmsen HJM, Garcia-Gil LJ and Flint HJ (2012). Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids and host-derived substrates for growth. *Applied and environmental microbiology* 78, 420 – 428
- Louis P and Flint HJ (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine (mini-review). *FEMS microbiology letters* 294, 1 – 8.

- Maia M, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, Mckain N, Larson TR *et al.* (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology* 10, 1 – 10
- Mäkinen VP, Soininen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K *et al.* (2006). Diagnosing diabetic nephropathy by ¹H NMR metabonomics of serum. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 19, 281 – 296
- Mäkinen VP, Tynkkynen T, Soininen P, Forsblom C, Peltola T, Kangas AJ *et al.* (2012). Sphingomyelin is associated with kidney disease in type 1 diabetes. *Metabolomics* 8, 369 – 375
- Marzzoco A and Torres B (2007). *Bioquímica Básica*, 3ª ed. (Guanabara Koogan, Rio de Janeiro)
- Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Kurihara S, Sawaki E *et al.* (2012). Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Scientific Reports* 2, 1 – 10
- Merchant ML and Klein JB (2010). Proteomic discovery of diabetic nephropathy biomarkers. *Adv Chronic Kidney Dis* 17, 480 – 486
- Ministério da Saúde, Portal da Saúde – Diabetes. Acedido em Ago. 7, 2012, disponível em www.min-saude.pt
- Nadkarni AM, Martin FE, Jacques NA and Hunter N (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148, 257 – 266
- Nabipour I (2003). Clinical Endocrinology in the Islamic Civilization in Iran. *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 1, 43 – 45
- Nicholson JK and Lindon JC (2008). Metabonomics. *Nature* 455, 1054 – 1056
- Orešic M, Simell S, Sysi-Aho M, Näntö-Salonen K, Seppänen-Laakso T, Parikka V *et al.* (2008). Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 2975 – 2984
- Overgaard AJ, Hansen HG, Lajer M, Pedersen L, Tarnow L, Rossing P *et al.* (2010). Plasma proteome analysis of patients with type 1 diabetes with diabetic nephropathy. *Proteome Science* 8, 1 – 11
- Pantosti A, Cerquetti M, Viti F, Ortisi G and Mastrantonio P (1989) Immunoblot analysis of serum immunoglobulin G response to surface proteins of *Clostridium difficile* in patients with antibiotic-associated diarrhoea. *J Clin Microbiol* 27, 2594 – 2597
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM and Cottrell JS (1999). Probability based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551 – 3567

- Pinto E, Barosa C, Jones JG, Anselmo M, Calha M and Faleiro ML. Faecal metabolite profile of children with type 1 diabetes. Cell Symposia Microbiome and Host Health, Lisbon Portugal 12-14 May 2013
- Poretzky L (2009). Principles of diabetes mellitus, 2nd ed. (Springer, New York)
- Prakash S, Tomaro-Duchesneau C, Saha S and Cantor A (2011). The Gut Microbiota and Human Health with an Emphasis on the Use of Microencapsulated Bacterial Cells. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011, 1 – 12
- Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M and Tomaro-Duchesneau C (2011a). Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. Biologics: Targets and Therapy 5, 71 – 86
- Randle PJ, Newsholme EA and Garland PB (1964). Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. Biochem J 93, 652 – 665.
- Ripoll BC and Leutholtz I (2011). Exercise and disease management, 2nd ed. (CRC Press, Boca Raton)
- Roesch LW, Lorca GL, Casella G, Giongo A, Naranjo A, Pionzio AM *et al* (2009). Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. The ISME Journal 5, 536 – 548
- Round JL and Mazmanian SK (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature Reviews Immunology 9, 313 – 324
- Ryan KJ and Ray CG (2004). Sherris, Medical Microbiology – An introduction to infectious diseases, 4th edition (McGraw-Hill, USA)
- Sanz Y, Santacruz A and De Palma G (2008). Insights into the roles of gut microbes in obesity. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2008, 1 – 9
- Sara M and Sleytr UB (2000). S-layer proteins. J Bacteriol 182, 859 – 868
- Savona-Ventura C and Mogensen CE (2009). History of Diabetes Mellitus. Elsevier Masson. 1st edition
- Sekirov I, Russell SL, Antunes CM and Finlay BB (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. Physiological Reviews 90, 859 – 904
- Song Y, Könönen E, Rautio M, Liu C, Bryk A, Eerola E *et al.* (2006). *Alistipes onderdonkii* sp. nov. and *Alistipes shahii* sp. nov., of human origin. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 1985 – 1990

- Suhre K, Meisinger C, Döring, A, Altmaier E, Belcredi P, Gieger C *et al.* (2010). Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *Plos One* 5, 1 – 11
- Takeoka A, Takumi K, Koga T and Kawata T (1991). Purification and characterization of s-layer proteins from *Clostridium difficile* GAI 0714. *J Gen Microbiol* 137, 261 – 267
- The Genome Institute (2013). Acedido em Abril, 2013, disponível em: <http://genome.wustl.edu/>
- Vaarala O, Atkinson MA and Neu J (2008). The “Perfect Storm” for Type 1 Diabetes, The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, and Mucosal Immunity. *Journal Diabetes* 57, 2555 – 2562
- VanGuilder HD, Bixler GV, Kutzler L, Brucklacher RM, Bronson SK, Kimball SR *et al.* (2011). Multi-modal proteomic analysis of retinal protein expression alterations in a rat model of diabetic retinopathy. *Plos One* 6, 1 – 16
- Verberkmoes NC, Russel AL, Shah M, Godzik A, Rosenquist M, Halfvarson J *et al.* (2009). Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *The ISME Journal* 3, 179 – 189
- Voet D and Voet J (2004). *Biochemistry* 3rd ed. (Wiley International Edition, USA)
- Von Mehring J and Minkowski O (1890). Diabetes mellitus nach pankreas exstirpation. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 26, 371–387.
- Wen L, Ley RE, Volchkov PV, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC *et al.* (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455, 1109 – 1113
- Wilmes P and Bond PL (2004). The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environmental Microbiology* 6, 911 – 920
- World Health Organization (2012). Diabetes. Acedido em Ago. 3, 2012, disponível em: http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA *et al.* (2011). Linking Long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105 – 108
- Wrong OM, Edmonds CJ and Chadwick VS (1981). *The Large Intestine, Its Role in Mammalian Nutrition and Homeostasis* (Halsted Press, New York)
- Zhi W, Purohit S, Carey C, Wang M and She JX (2010). Proteomic technologies for the discovery of type 1 diabetes biomarkers. *Journal of Diabetes Science and Technology* 4, 993 – 1002

Capítulo 7 – Anexos

Anexo 1 – Inquérito respondido pelos indivíduos que participaram no estudo



**Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia**

Questionário adultos com DT1 envolvidos no estudo da microbiota intestinal

Dados do Paciente

Código de registo do paciente: _____

Idade: _____ **Sexo:** F M **Nº de irmãos:** _____

Formação académica dos pais: _____

Informações sobre determinantes na composição da microbiota intestinal

1)- Durante a sua gestação, a sua mãe teve diabetes gestacional?

Sim

Não

2)- Qual foi o tipo de parto: Eutócico (normal ou vaginal)

Distócico (fórceps, ventosa, cesariana)

3)- Como define a sua dieta:

- regular (carne ou peixe, ovos, vegetais, fruta e leite de origem normal [de origem não-orgânica])
- vegetariana (nenhuma carne / peixe mas outros produtos de origem [de origem não-orgânica])
- orgânica (> 50% de carne, ovos, vegetais, fruta e leite de origem orgânica [sem utilização de fertilizantes, pesticidas e outros produtos químicos])

4)- Com que regularidade come fruta? Diariamente (pelo menos 1x por dia)

Semanalmente (pelo menos 1x por semana)

4.1) Indique qual ou quais as frutas que prefere consumir:

Laranja

Maçã

Pêra

Banana

Uvas

Manga

Papaia

Ananás

Morangos

Kiwi

Ameixa

Cerejas

Nesperas

Outra, Qual? _____

5)- Com que regularidade come vegetais?

Diariamente (pelo menos 1x por dia);

Semanalmente (pelo menos 1x por semana)

5.1)- Marque com uma X os vegetais e leguminosas que consome diariamente ou semanalmente. (Pode assinalar mais do que uma opção):

Alface

Couve

Couve-flor

Bróculos

Tomate

Pepino

Abóbora

Beringela

Courgete

Espinafre

Rúcula

Cenoura

Pimento

Rebentos de soja

Feijão

Grão

Ervilhas

Favas

Outros: (Se pretender, pode adicionar algum vegetal ou leguminosa que consome e não se encontra na lista): _____

6) Consome logurtes? Sim Não

6.1 Se sim, com que regularidade?

Diária (pelo menos 1x por dia)

Semanal (pelo menos uma vez por semana)

Esporadicamente, pelo menos 1 x por mês

7) O seu funcionamento intestinal é diário? Sim Não Se não qual a regularidade semanal: _____

8) Faz diariamente ou semanalmente alguma medicação, para além da tomada de insulina?

Sim Não Qual? _____

9) Foram-lhe administrados ou receitados antibióticos nos últimos três meses?

Sim Não

10) Já contraiu algum tipo de infecção no último ano? Sim Não

Qual(is) e quando? _____

11) Possui algum tipo de alergia? Sim Não Qual? _____

12) Esteve hospitalizado nos últimos 6 meses? Sim Não

13) Pratica desporto? Sim Não

Se sim, indique que tipo de desporto e quantas vezes por semana o pratica: _____

Consentimento

Declaro para os devidos efeitos que disponibilizo amostras de fezes para o presente estudo, devendo estas ser tratadas com confidencialidade.

Assinatura:

Data:

__/__/____

Anexo 2 – Optimização do protocolo de extração proteica a partir da microbiota intestinal

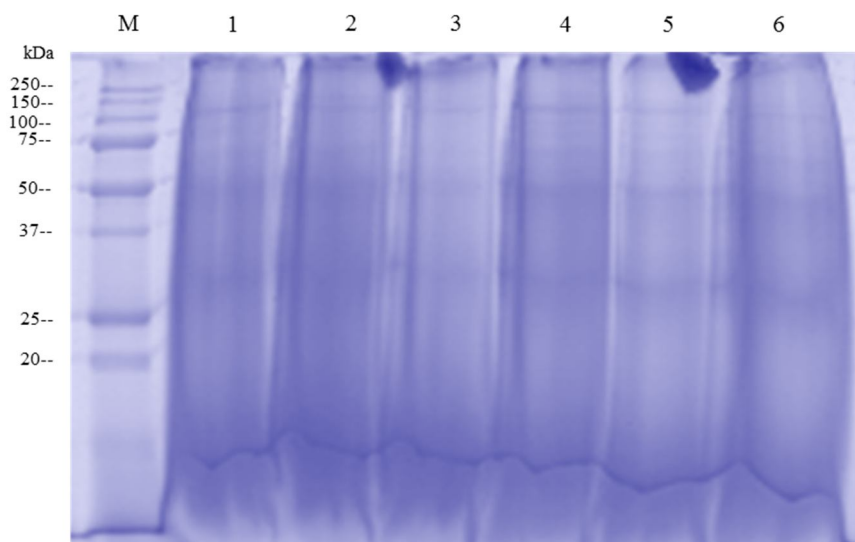


Figura 7.1 - Gel de SDS-PAGE do extrato proteico obtido de fezes. O gel foi corado com Coomassie blue. M – Precision Plus Protein™ All Blue Standards #161-0373; 1 – sem cloranfenicol, 15 min de sonicação e 4,95 µg/µL de proteína; 2 – sem cloranfenicol, 20 min de sonicação e 4,22 µg/µL de proteína; 3 – sem cloranfenicol, 30 min de sonicação e 4,51 µg/µL de proteína; 4 – com cloranfenicol, 15 min de sonicação e 6,07 µg/µL de proteína; 5 – com cloranfenicol, 20 min de sonicação e 5,38 µg/µL de proteína; 6 – com cloranfenicol, 30 min de sonicação e 6,26 µg/µL de proteína.

De acordo com os resultados do gel representado na Figura 7.1, um período de 15 min de sonicação é suficiente para provocar a lise celular. A utilização de cloranfenicol (200µL/20ml) em comparação com a amostra sem tratamento, com cloranfenicol (4, 5 e 6) causou um melhor delineamento das bandas proteicas o que terá ocorrido pela paragem da síntese proteica, em particular a síntese de proteases que poderão ter causado alguma degradação das proteínas obtidas nas amostras não tratadas com cloranfenicol (1, 2 e 3).

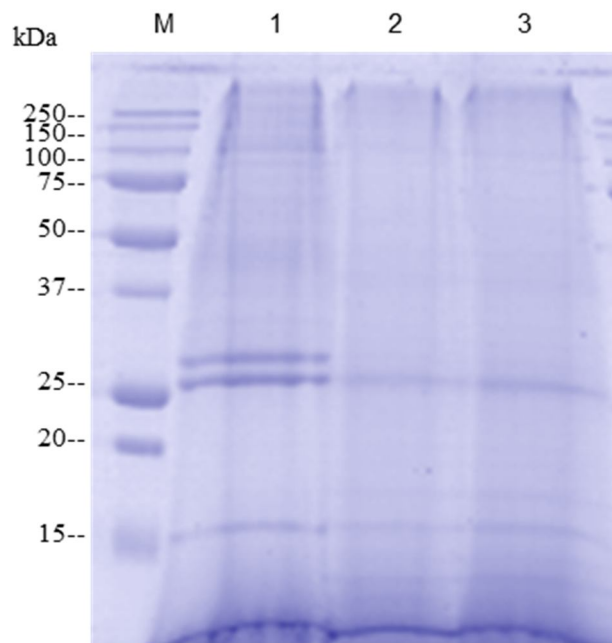


Figura 7.2 - Gel de SDS-PAGE do extrato proteico obtido de fezes. O gel foi corado com Coomassie blue. M – Precision Plus Protein™ All Blue Standards #161-0373; 1 – precipitação com acetona para 4,22 µg/µL de proteína num volume de 6,6µL; 2 – precipitação com acetona e TCA para 2,33 µg/µL de proteína num volume de 12µL; 3 – precipitação com acetona para 4,22 µg/µL de proteína num volume de 10µL.

O gel de SDS-PAGE evidencia que a precipitação da proteína com acetona e TCA (1350 µL de acetona para 2g TCA) ocorre uma melhor definição das bandas proteicas.

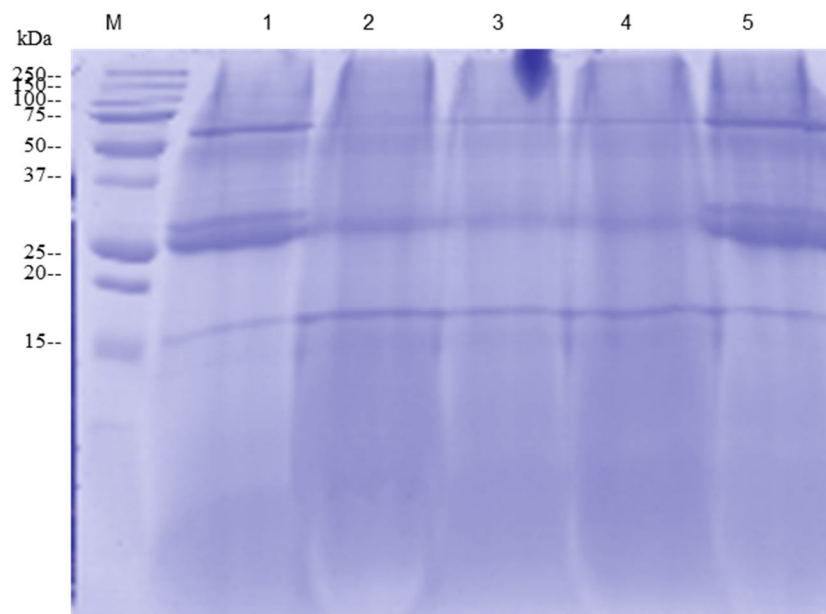


Figura 7.3 - Gel de SDS-PAGE do extrato proteico obtido de fezes. O gel foi corado com Coomassie blue. M – Precision Plus Protein™ All Blue Standards #161-0373; 1 – tampão de lise, precipitação com acetona e TCA para 2,42 µg/µL de proteína num volume de 5,6 µL; 2 – tampão de lise com UTCHAPS, precipitação com acetona e TCA para 1,13 µg/µL de proteína num volume de 12 µL; 3 – tampão de lise com UTCHAPS, precipitação com acetona para 3,46 µg/µL de proteína num volume de 3,9 µL; 4 – tampão de lise com UTCHAPS, precipitação com acetona para 3,46 µg/µL de proteína num volume de 7 µL; 5 – tampão de lise, precipitação com acetona e TCA para 2,42 µg/µL num volume de 10 µL.

Aos resultados obtidos no gel da Figura 7.3 indicam que a utilização do tampão de lise constituído por ureia-tioureia-CHAPS (7M ureia:2M tioureia:4% w/v CHAPS) causa um decréscimo no número de bandas proteicas (2, 3 e 4), enquanto a utilização do tampão de lise constituído por Tris, EDTA e DTT, associada à precipitação de proteína com acetona e TCA (1350 µL acetona:2g TCA) evidencia a obtenção de bandas proteicas mais definidas e bem demarcadas (1 e 5) como se pode observar na figura acima.

Anexo 3 – Análise Metabolómica

Os valores referentes as pesagens da amostra para posterior análise do perfil metabolómico de cada indivíduo (saudável e diabético) encontram-se na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 – Pesos das amostras de fezes para análise metabolómica

Controlos	Peso de amostra (mg)	Diabéticos	Peso de amostra (mg)
AC1	109	AD1	109
AC2	100	AD2	109
AC4	109	AD3	108
AC5	106	AD4	105

Anexo 4 – Marcador com pesos moleculares utilizado

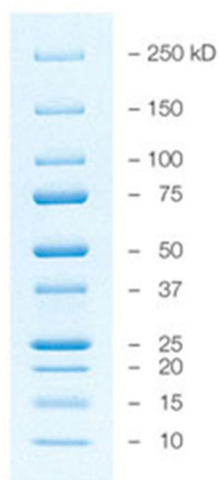


Figura 7.4 – Marcador Precision Plus Protein Prestained Standards, all blue (Bio-Rad).

Anexo 5 – Análise do proteoma da microbiota intestinal (outros resultados obtidos)

Tabela 7.2 – Identificação dos pontos proteicos da microbiota intestinal de jovens adultos diabéticos e de jovens saudáveis

Categoria Funcional	Ponto Proteico ID	NCBI gi	Proteína	Massa Molecular (Da)		Ponto Isoelétrico		Score	Peptide Matching	Cobertura da sequência (%)	Microrganismo
				T	E	T	E				
Proteínas apenas observadas no proteoma da microbiota intestinal de jovens adultos diabéticos											
Metabolismo de Ácidos Gordos	1189	313113539	3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase	31588	35528	6,22	6,69	131	4/12	40	<i>Faecalibacterium cf. prausnitzii</i> KLE1255
		257439028	3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase	31602	35528	6,36	6,69	116	4/11	38	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> A2-165
	1190	119370275	β-hidroxibutiril-CoA desidrogenase	31591	36027	5,49	5,98	177	8/19	36	<i>Roseburia intestinalis</i> L1-82
Metabolismo da Galactose	1003	150006364	UDP-glucose 4-epimerase	38130	43195	5,55	5,80	44	2/12	34	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482
Hidrolase	1604	120405367	Alfa/beta hidrolase proteína de fold	29898	15593	5,16	6,66	37	1/1	3	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1
<i>Chaperone</i> (Família das Ciclofilinas)	1604	430759507	FKBP-tipo peptidil-prolil cis-trans isomerase SlpA	16408	15593	4,15	6,66	38	1/1	9	<i>Thioalkalivibrio nitratreducens</i> DSM 14787
Função Desconhecida	837	225378410	Proteína Hipotética ROSEINA2194_04078	41471	48977	5,66	6,46	136	6/13	32	<i>Roseburia inulinivorans</i> DSM 16841
	1243	167766972	Proteína Hipotética CLOSS21_01489	30812	33133	5,20	5,46	49	2/6	22	<i>Clostridium</i> sp. SS2/1
	1243	153810083	Proteína Hipotética RUMOB_E_00464	26109	33133	4,86	5,46	53	1/1	5	<i>Ruminococcus obeum</i> ATCC 29174
	1581	153854358	Proteína Hipotética DORLON_01652	20082	17435	5,24	5,00	65	2/5	31	<i>Dorea longicatena</i> DSM 13814
Proteínas mais abundantes no proteoma da microbiota intestinal de jovens adultos saudáveis											
Transferase (Acetiltransferase)	821	261366434	Acetil-CoA acetiltransferase	41232	49546	5,76	6,5	70	4/4	9	<i>Subdoligranulum variabile</i> DSM 15176
		255527688	Acetil-CoA acetiltransferase	41506	49546	8,11	6,5	53	1/3	8	<i>Clostridium carboxidivorans</i> P7
Atividade Acyl-CoA Desidrogenase	821	350270020	Acil-CoA desidrogenase	42178	49546	5,83	6,5	68	2/3	9	<i>Oscillibacter valericigenes</i> Sjm18-20
Flagelo bacteriano (Locomoção)	821	113911621	Fla2 flagelina	48205	49546	4,90	6,5	77	2/4	3	<i>Eubacterium rectale</i> DSM 17629
Função Desconhecida	977	373116920	Proteína Hipotética HMPREF0995_01907	21632	44258	4,42	6,3	31	1/1	7	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 7_1_58FAA

Legenda: T – valor teórico; E – valor experimental

A categoria funcional e os processos biológicos das proteínas identificadas foram anotados de acordo com as bases de dados consultadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> e <http://www.uniprot.org/>)

Anexo 6 – Esquemas representativos da β -oxidação dos ácidos gordos e da glicólise, mencionados no Capítulo 4 – Discussão.

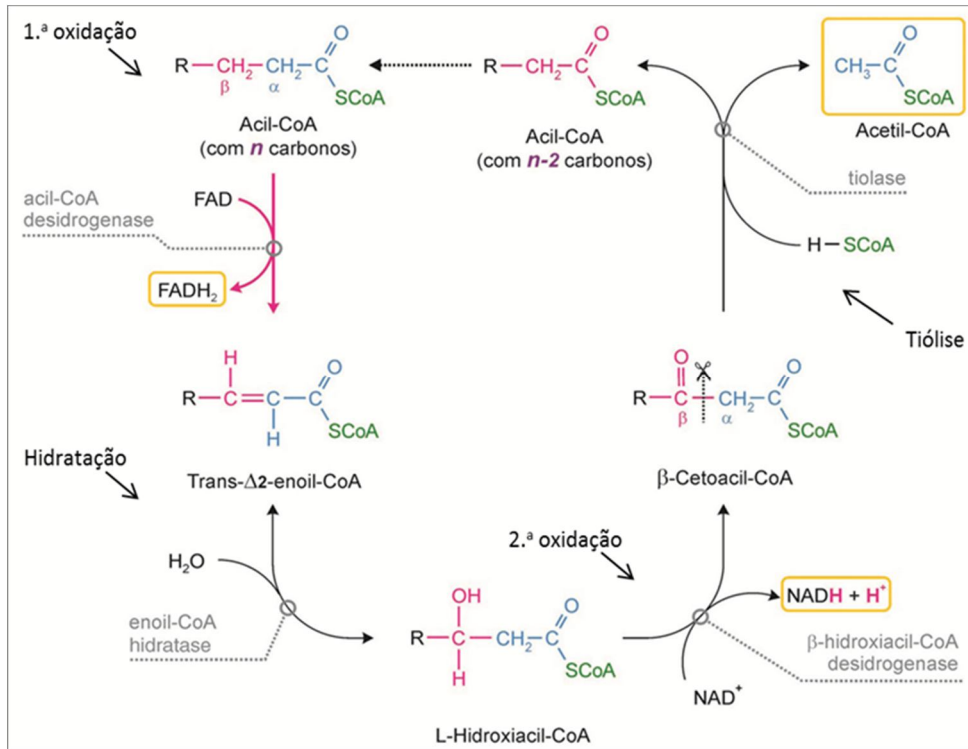


Figura 7.5 – Esquema da β -oxidação dos ácidos gordos (Adaptado de: Marzzoco e Torres, 2007)

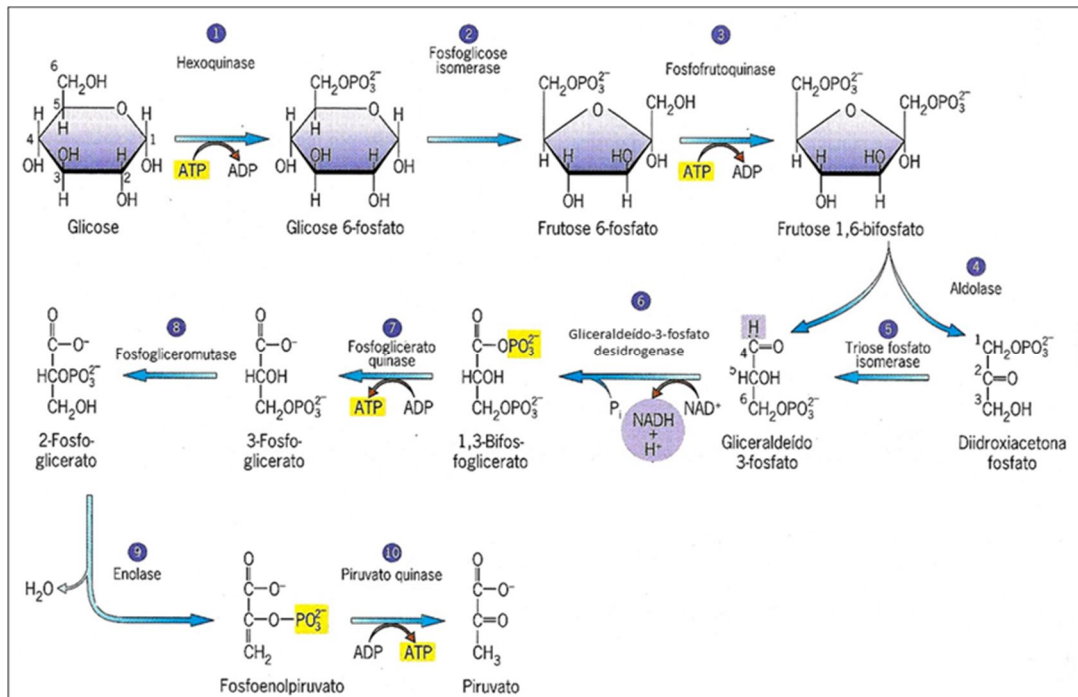


Figura 7.6 – Metabolismo da Glicose - Glicólise (Adaptado de: John Wiley & Sons, 1999)