

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - PPGBCM

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIANO INTESTINAL EM RATOS *WISTAR*
DIABÉTICOS TIPO 1 TRATADOS COM DIFERENTES DOSES DE
RESVERATROL**

BRUNO SILVEIRA ADAMI

Orientador: Prof. Dr. André Arigony Souto

Porto Alegre, 2016

BRUNO SILVEIRA ADAMI

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIANO INTESTINAL EM RATOS *WISTAR*
DIABÉTICOS TIPO 1 TRATADOS COM DIFERENTES DOSES DE
RESVERATROL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. André Arigony Souto

Porto Alegre, 2016

BRUNO SILVEIRA ADAMI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Maria Martha Campos

Rafael Andrade Caceres

Carmem Juracy Silveira Gottfried

Porto Alegre, 2016

Ficha Catalográfica

A198a Adami, Bruno Silveira

Avaliação do perfil microbiano intestinal em ratos Wistar diabéticos tipo 1 tratados com diferentes doses de Resveratrol / Bruno Silveira Adami . – 2016.

76 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Andre Souto Arigony.

1. microbiota. 2. A.muciniphila. 3. resveratrol. 4. diabetes tipo 1.
I. Arigony, Andre Souto. II. Título.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao professor Andre Arigony, pela oportunidade da realização de um sonho. Obrigada pelos ensinamentos e lições aprendidas ao longo do curso.

Agradecer a todos os técnicos do laboratório da Faculdade de Química, visto que, sempre foram muito atenciosos e sempre me trataram com muito carinho.

Agradecer a minha colega de mestrado Juliana Ribeiro Baesso pela grande amizade e pela troca de conhecimento durante curso.

Agradecer aos meus colegas de mestrado por grandes conversas e troca de ideias ao longo do curso.

Agradecer aos meus pais, a todo amor e paciência, sempre dando suporte e apoio para alcançar meus objetivos.

Agradecer especialmente a minha companheira Renata Guazzelli da Silva por trilhar este caminho ao meu lado durante o curso e, entender minhas ausências.

A CAPES e PUCRS agradeço pelo financiamento ao longo destes anos.

“Algumas pessoas acreditam que só grandes forças podem manter o mal afastado, mas não é o que eu penso, acredito que são pequenos detalhes, ações diárias de pessoas comuns, simples gestos de bondade e amor!”

“J.R.R. TOLKIEN”

RESUMO

Os estudos sobre resveratrol têm aumentado de forma notável nos últimos anos. Este aumento está diretamente relacionado com a versatilidade do composto, popularmente conhecido em decorrência aos benefícios do vinho. Contíguo ao resveratrol, outro assunto crescente na comunidade científica é a microbiota e sua possível modulação através de compostos com ação prebiótica. Sabendo-se que o resveratrol ainda não tem um mecanismo de ação consolidado e, que grande quantidade do composto fica retida no trato gastrointestinal. O presente trabalho avaliou a influência da ingestão de resveratrol e, seu metabólito, dihidroresveratrol, em populações bacterianas específicas. Para a indução da disbiose intestinal, foi utilizado um modelo experimental de diabetes tipo 1 em ratos. O tratamento com resveratrol foi realizado durante trinta dias, com doses diárias de 5, 10 e 20 mg.kg⁻¹. A quantificação dos metabólitos de resveratrol foi realizada através de UPLC-MS / MS (*Ultra-Performance Liquid Chromatography-lectrospray Tandem Mass Spectrometry*). A quantificação da *A. muciniphila*, *Bacteroidetes* e *Prevotella* ocorreu através de qPCR (*Reaction Polimerase Chain*). O estudo demonstrou aumento na população de *A. muciniphila*, *Bacteroidetes* e *Prevotella* tanto em ratos normais, quanto em animais diabéticos tratados com resveratrol. Este aumento demonstrou uma resposta não linear. O metabólito apresentou uma produção dependente da dose, no entanto, foi observado um aumento significativo nos animais saudáveis em relação aos ratos diabéticos. Observaram-se também diferentes correlações entre as Bactérias e o metabólito do resveratrol em animais saudáveis e diabéticos. Em suma, o presente estudo demonstra que o tratamento com resveratrol promove alterações na microbiota. Foi observado aumento de populações bacterianas importantes para a saúde intestinal, como: *A. muciniphila*, *Bacteroidetes*, em ratos *Wistar* saudáveis e diabéticos, de maneira não linear.

Palavra chave: microbiota, resveratrol, A. muciniphila, Bacteroidetes, Prevotella, UPLC-MS/MS, qPCR

ABSTRACT

The number on the citations of resveratrol has been increased over the last decade. This increase is directly related to the versatility of compound, commonly known by the benefits of wine. Contiguous to resveratrol, another growing issue in the scientific community is the microbiota and its possible modulation by compounds with prebiotic action. It is well known that resveratrol does not have a consolidated mechanism of action, and large amounts of the compound are retained in the gastrointestinal tract, we analyze the influence of resveratrol ingestion and their metabolite in populations of specific bacteria. For the induction of intestinal dysbiosis, we used experimental model of type 1 diabetes in rats. The treatment with resveratrol was performed during thirty days with daily doses of 5, 10 and 20 mg.kg⁻¹. The quantification of the metabolite and resveratrol was accomplished through UPLC-MS/MS (*Ultra-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry*). Quantification of *A. muciniphila*, *Bacteroidetes* and *Prevotella* was carried out by qPCR (*Polymerase Chain Reaction*). The study demonstrated increased population of *A. muciniphila*, *Bacteroidetes* and *Prevotella* in both normal and diabetic rats treated with resveratrol. This increase presented nonlinear response. The metabolite production was dose-dependent, however, a significant increase was observed in healthy animals compared to diabetic rats. We also observed significant correlation between different bacteria and resveratrol metabolite in healthy and diabetic animals. In conclusion, our study shows that treatment with resveratrol promotes changes in the microbiota. Data also revealed an increase in bacterial populations very important for intestinal health, such as: *A. muciniphila*, *Bacteroidetes* in healthy and diabetic Wistar rats in nonlinear manner.

Key words: microbiota, resveratrol, A. muciniphila, Bacteroidetes, Prevotella, UPLC-MS/MS, qPCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Primers	55
Tabela 2 - Desenho do Estudo.....	57
Tabela 3 – Peso e glicemia	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 2 Estrutura do resveratrol	15
Figura 3 Diferença entre resveratrol e dihidroresveratro.....	16
Figura 4 Quantidade e gêneros bacterianos ao longo do trato gastro intestinais.....	18
Figura 5 Característica do muco ao longo do trato gastro intestinal.	21
Figura 6 Estrutura e composição epitelial no intestino.....	22
Figura 7 Desestabilização das tigh junctions.....	24
Figura 8 Cronologia do processo de indução e tratamento	54
Figura 9 RMN 1H e RMN 13C.	58
Figura 10 Espectro de ultravioleta.....	59
Figura 11 Íon molecular do dihidroresveratrol e resveratrol.	60
Figura 12 Cromatogramas	60
Figura 13 Curva de calibração do resveratrol e dihidroresveratrol.	62
Figura 14 Quantificação de resveratrol (A) e dihidroresveratrol (B).	63
Figura 15 Quantificação de <i>A. muciniphila</i>	64
Figura 16 Quantificação de <i>Bacteroidetes</i>	65
Figura 17 Quantificação de <i>Prevotella</i>	65
Figura 18 Correlação entre <i>A. muciniphila</i> e dihydroresveratrol	66
Figura 19 Correlação entre <i>Bacteroidetes</i> e dihydroresveratrol.....	67
Figura 20 Correlação entre <i>Prevotella</i> e dihydroresveratrol	67

ABREVIATURAS

AMP – Peptídeo Antimicrobiano

ATP – Adenosina Trifosfatada

C-13 – Carbono isótopo 13

DM 1– Diabetes Mellitus tipo 1

DM 2 – Diabetes Mellitus tipo 2

FCE - Fator de Crescimento Epitelial

GABA – Ácido Gama Aminobutirico

GLP-1 – Glucagon-Like Peptide-1

GLUT 2 – Transportador de Glicose

GPR – Receptores Acoplados à Proteína G

HDAC – Histona Desacetilase

LPS – Lipopolisacarídeo

MUC 2 – Mucina 2

MUC 5A – Mucina 5A

NAD+ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NOD - Domínio de Oligomerização de Ligação de Nucleotídeos

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

SCFA – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

SIRT - Silent Information Regulator (Regulador de Silenciamento de Informação)

STZ – Estreptozotocina

TGI – Trato Gastrointestinal

THF – Tetrahydrofurano

TLR – Toll-Like Receptors

UV – Ultravioleta

Sumário

CAPÍTULO 1	14
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	14
INTRODUÇÃO.....	15
Resveratrol.....	15
Microbiota	18
Papel das Bactérias	19
Papel do Intestino	20
Diabetes tipo 1	22
Relação da diabetes tipo 1 e microbiota	23
<i>Akkermansia municipihila</i>	25
<i>Bacteroidetes</i>	26
<i>Prevotella</i>	27
OBJETIVO	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
JUSTIFICATIVA	29
CAPÍTULO 2	30
ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA RCS – MOLECULAR NUTRITION AND FOOD RESEARCH	30
CAPÍTULO 3	49
METODOLOGIA, RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	49
MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
MATERIAIS E SOLVENTES	50

	13
SINTESE DO DIHIDRORESVERATROL.....	50
ULTRAVIOLETA	51
ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	51
RMN (Ressonancia magnética nuclear)	52
ANIMAIS	52
DESENHO DO ESTUDO	52
TRATAMENTO ORAL.....	53
INDUÇÃO AO DIABETES TIPO 1	53
COLETA DAS FEZES.....	54
EXTRAÇÃO DO RESVERATROL E METABÓLITOS	54
Detecção de DNA das Bactérias.....	55
ANÁLISE EM HPLC E UPLC-MS/MS	55
ESTATÍSTICA.....	56
 RESULTADOS.....	 58
Caracterização da síntese do dihidroresveratrol	58
RMN.....	58
Ultravioleta	59
Espctrometria de Massa.....	59
Modelo de indução a diabetes tipo 1	61
Glicemia e peso corporal	61
Curva de calibração do resveratrol e dihidroresveratrol.....	62
Quantification of resveratrol and dihydroresveratrol	62
Quantificação de <i>A.muciniphila</i>	63
Quantificação de <i>Bacteroidetes</i>	63
Quantificação de <i>Prevotella</i>	64
Correlação entre <i>A. Muciniphila</i> , resveratrol e dihydroresveratrol	66
Correlação entre <i>Bacteroidetes</i> , resveratrol e dihydroresveratrol	66
Correlação entre <i>Prevotella</i> , resveratrol e dihydroresveratrol.....	66
DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO 1	82

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

INTRODUÇÃO

Resveratrol

O resveratrol foi isolado primeiramente em 1940, a partir da raiz de *Veratrum Diflorum*, o heléboro branco. Alguns anos depois em meados de 1960, foi isolado da raiz de *Polygonum cuspidatum*, uma planta da medicina tradicional oriental, usada para tratar dislipidemias, doenças inflamatórias, hipertensão, alergias e infecções fúngicas. (SIEMANN *et al* 1992, JUAN ME *et al* 2002)

Atualmente, sabe-se que o resveratrol tem como estrutura base estilbenóide, na qual tem uma conformação estrutural 3,5,4'-trans-trihidroxi estilbeno (FIGURA 1), ou simplesmente chamado de *trans*-resveratrol. Esta estrutura consiste de dois anéis fenólicos ligados a uma olefina. A produção do resveratrol em produtos naturais depende de uma série de fatores de cultivo, como clima e a maturidade do fruto. O resveratrol é produzido por plantas em resposta à agressão de microorganismos, o que o classifica como uma fitoalexina. (ZAMORA-ROS, R. *et al.* 2008, BODE, L. M. *et al* 2013, PANTUSA, M 2014)

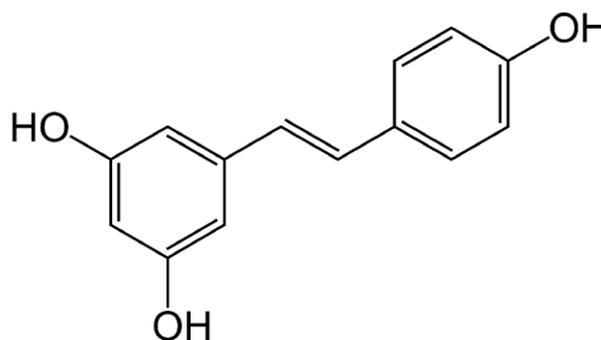


Figura 1 Estrutura do resveratrol - 3,5,4'-trans-trihydroxy estilbeno. (BODE, L. M. *et al.* 2013)

Sabe-se, atualmente, que o polifenol pode ser encontrado em amendoins, ameixas, uvas, raiz de azeda, dentre outras frutas. (ZAMORA-ROS, R. *et al* 2008, MARTELO-VIDAL, M. J. *et al* 2014) O resveratrol chamou primeiramente a atenção em 1997, quando um estudo demonstrou seu potencial anticarcinogênico *in vitro* (FRANCIOSO, A. *et al.* 2014). Este estudo, realizado com linhagens de células de câncer de mama (MCF-7), revelou ação dose-dependente do resveratrol, diminuindo a proliferação celular. Com o passar do tempo, diversos estudos foram publicados demonstrando o potencial antiinflamatório do

resveratrol (TRELA, B *et al* 1996), antioxidante (KIM, H *et al* 2011) e cardioprotetor (SUN, X *et al* 2008).

Apesar de sua versatilidade, até o momento o mecanismo de ação do resveratrol e, seu real efeito biológico ainda não foi elucidado, apenas propostas de mecanismos são feitas acerca do polifenol. Dentre elas, a via das sirtuinas mostra-se uma proposta relativamente valida ate o momento. A ação antienvhecimento do resveratrol vem sendo relacionada ao seu controle em SIRT-1, sabendo que esta possui efeitos diretos no metabolismo celular, indução de morte celular, processos de diferenciação e proliferação (MICHAN, S *et al* 2007).

Um fator polêmico sobre as supostas vias e efeito do resveratrol envolve sua baixa biodisponibilidade. Esta tem sido alvo de grande discussão entre os grupos de pesquisa envolvidos. Um estudo publicado por WALLE, T. *et al.* 2004, demonstrou a baixa biodisponibilidade(BD) do resveratrol e seu rápido declínio na concentração plasmática. Neste estudo, o polifenol marcado com carbono 13 foi administrando por duas vias, intravenosa (E.V), e via oral. Paralelo à baixa BD, o estudo presenciou metabólitos do resveratrol no plasma e intestino, havendo uma rápida metabolização hepática e intestinal. Os metabólitos hepáticos se mostraram sulfatados e glicuronizados, enquanto os metabólitos intestinais apresentou hidrogenação olefinica (FIGURA 2). Este grande nível de metabólitos presentes no plasma apresenta rápida produção, fazendo com que a quantidade de resveratrol ingerido, não seja representada de maneira fiel na corrente sanguínea.

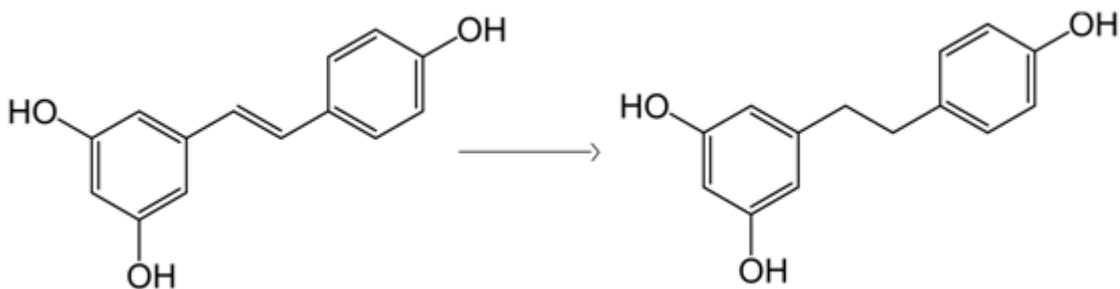


Figura 2 Diferença entre a estrutura do resveratrol (à esquerda) e dihidroresveratrol (à direita). Pode se notar a hidrogenação da transolefina na estrutura do dihidroresveratrol. (CARDILE, V. *et al.*2005)

Além da questão da biodisponibilidade, os estudos vêm demonstrando divergências em relação à eficácia do resveratrol, onde o principal fator limitante da

resposta é a dose administrada. As populações utilizadas, humanos ou animais, demonstraram diferentes respostas frente ao tratamento com resveratrol. Um artigo de revisão publicado por VISIOLI 2014 descreve o resveratrol como um “fiasco”, após expor uma série de estudos onde o polifenol não apresenta efeito, principalmente em humanos. Em contrapartida, um estudo publicado por PARK *et al.* 2015 demonstra opinião diferente. Neste trabalho o autor destaca o grande número de estudos publicados nos últimos anos, os quais demonstram o resveratrol com grande potencial em relação a seus efeitos biológicos. O autor ainda, atenua as críticas em relação às diferentes respostas *in vivo*, e defende que não foi encontrada uma dose adequada e ideal para o composto.

Devido a esta controvérsia, algumas hipóteses vêm sendo apresentadas, dentre elas, a de que cerca de 42% do resveratrol ficaria acumulado no trato gastrointestinal, como descrito por QUEIPO-ORTUÑO *et al.* 2012 Esta retenção gástrica poderia estar agindo na modulação da população microbiana, servindo como substrato para as Bactérias intestinais. Alguns estudos sobre modulação microbiana e o resveratrol já foram publicados. Estes estudos demonstram a ação do polifenol sobre a microbiota e o ambiente intestinal. O estudo, publicado por QIAO *et al.* 2014 demonstrou o aumento de Bactérias comensalistas, probióticas, e a melhora de parâmetros como redução da inflamação do tecido adiposo, e diminuição do peso corporal de animais submetidos à dieta hipercalórica(HFD). O estudo demonstrou, ainda, a melhora da taxa de *Bacterioides-Firmicutes*, e a inibição do crescimento de *Enterococcus Faecalis*, bactéria encontrada em casos de disbiose.

Outro estudo que relaciona o resveratrol à microbiota, foi o realizado por LARROSA *et al.* 2009 Este trabalho demonstrou também um aumento de bactérias próbóticas, em modelos de colite, e a diminuição de bactérias relacionadas a disbiose causada pela doença. Uma hipótese indica que o resveratrol pode atuar como um agente modulador da microbiota é de que o composto é usado como substrato pelas bactérias, gerando metabólitos secundários. O dihidroresveratrol (3,4',5-trihydroxybibenzyl), metabólito do resveratrol gerado pelas bactérias, esta presente em uma série de trabalhos, os quais pesquisam metabólitos hepáticos e microbianos. O estudo de BODE *et al.* 2013, analisou os metabólitos do resveratrol produzidos nas fezes, correlacionando com os níveis de bactéria. O dihidroresveratrol esteve presente em fezes de humanos saudáveis, após a ingestão de resveratrol. Outra abordagem para o metabólito, é o estudo de farmacocinética realizado por ROTCHES-RIBALTA *et al.* 2012, em humanos, demonstrando a produção do metabólito pelas bactérias intestinais, após a ingestão de vinho tinto e extrato de uva. O trabalho de WANG *et al.* 2006, apresenta o

metabolismo de um análogo do resveratrol, o piceid(Reservatrol-3- β -mono-D-glucoside). Este composto análogo detem a mesma característica, após ser metabolizado pelas Bactérias intestinais, formando o dihidro-piceid.

Microbiota

A microbiota consiste de um microambiente encontrado naturalmente em mamíferos; acredita-se que contenha cerca de 5000 espécies de Bactérias e 10^{14} microrganismos/ml. Dentre as espécies presentes no trato gastrointestinal (TGI), o filo com maior predominância é o das *Bacteroidetes*, seguido das *Firmicutes*, sendo estas, em sua grande maioria, Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente (FIGURA 3) (GOMES, A. *et al* 2014, STILLING, R *et al* 2014).

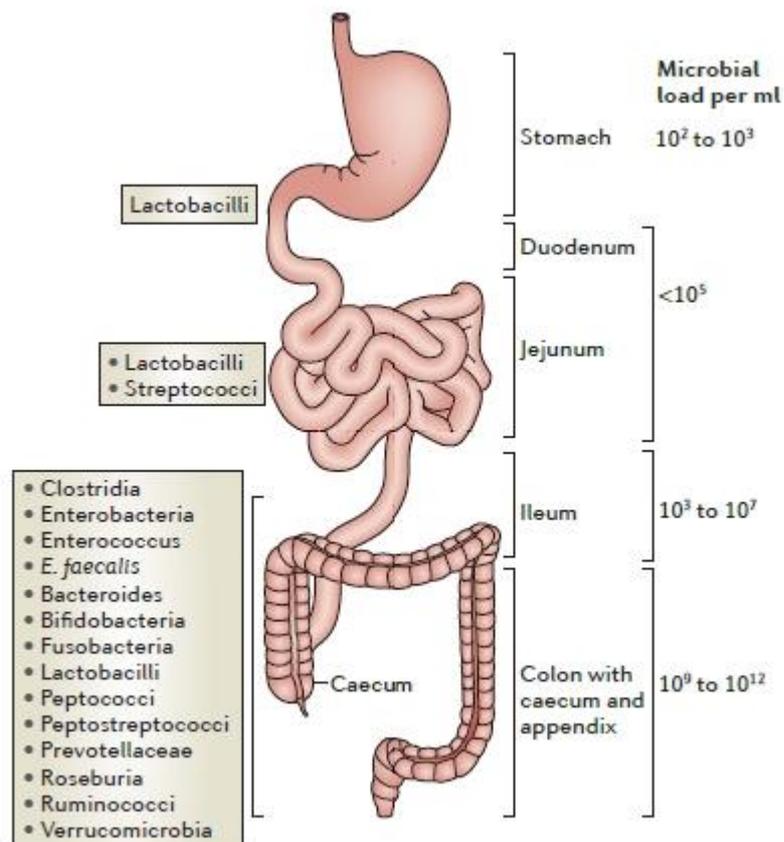


Figura 3 Quantidade e gêneros bacterianos ao longo do trato gastro intestinalis.

(MOWAT. AND AGACE 2014)

O papel da microbiota em relação ao hospedeiro pode ser considerado comensalista, visto que há uma troca de benefícios, entre Bactérias e o sistema. Esta partilha de benefícios

resultaria em uma proteção e produção de nutrientes essenciais para o hospedeiro (GOMES, A. *et al* 2014). A microbiota intestinal é relativamente estável, tendo como fatores de alteração o pH, a temperatura, a baixa tensão de oxigênio, o substrato nutricional (açúcares complexos), fontes de carbono e os peptídeos antimicrobianos gerados por bactérias ou células intestinais. (PAMER, E. *et al* 2014) A microbiota tem sido estudada ultimamente como um intermediário entre a dieta e doenças metabólicas como diabetes tipo 1 e 2 (WEN, L. *et al.* 2011), síndrome metabólica (DUMAS, M. *et al* 2006) e doença celíaca (INRNACULADA N. *et al.* 2007). No entanto, outras desordens têm sido associadas à microbiota, bem como, a alterações e desordens comportamentais, como o autismo e depressão. Estudos demonstraram que uma microbiota disbiótica pode exercer um papel potencial na depressão, com o aumento de bactérias da espécie *oscilobacteria*. Esta bactéria estaria envolvida na produção de ácido valérico, um análogo do Ácido Gama Aminobutírico (GABA), estando envolvida na ativação da via inibitória no SNC, levando a quadros depressivos. (NASERIBAFROUEI, A. *et al.* 2014) Em indivíduos com autismo, foi constatada uma maior depleção fecal de aminoácidos precursores de neurotransmissores essenciais para a saúde mental, como triptofano, treonina, glutamato dentre outros (DE ANGELIS, M. *et al.* 2013).

Papel das Bactérias

A grande diversidade de bactérias que reside no intestino, em seu perfil normal, exerce diferentes funções, as quais estão diretamente ligadas ao seu caráter comensalista. Estas bactérias, por sua vez, acabam trazendo benefícios ao ambiente intestinal e metabólico, protegendo o estado metabólico normal do corpo. Dentre elas estão depósitos de nutrientes essenciais para o crescimento e diferenciação de células epiteliais, estímulo do sistema imune, degradação de componentes não digestivos da dieta, equilíbrio da quantidade de bactérias intestinais e produção de compostos necessários para o organismo, bem como a vitamina A (KNIGHT, D. *et al.* 2003) . Um dos principais compostos produzidos pelas bactérias, são os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA). Estes têm sido designados como possíveis agentes imunomoduladores, além de auxiliar no controle de secreção de insulina. Dentre os principais, SCFA, estão o butirato, propionato e acetato. O papel imunomodulador dos SCFA esta associado à expressão gênica, através de sua ligação aos receptores acoplados à proteína

G (GPR41 e 43). Esta ligação auxilia na sinalização de células como os neutrófilos, ajudando no recrutamento de outras células imunes. A relação de SCFA com as GPR 41 tende a auxiliar na modulação do peptídeo GLP-1(*glucagon like peptide-1*), o que melhora os índices de secreção de insulina (MASLOWSKI, K. *et al.* 2009, SINA, C. *et al.* 2009, TOLHURST, G. *et al.* 2012). Outro efeito relacionado aos SCFA relaciona-se ao butirato, sendo que o mesmo parece auxiliar na inibição de HDAC em células do colon, exercendo papel nos processos energéticos das células. Por outro lado, o acetato e o propionato parecem exercer papel nos tecidos, principalmente no fígado, onde servem de substrato para a gliconeogênese e lipogênese (VALENTINA T. *et al.* 2012).

Outro componente gerado por bactérias no intestino são as substâncias antimicrobianas, que ajudam a manter uma homeostasia positiva probiótica. Este processo ajudaria a combater as bactérias patogênicas transitórias presentes no meio (KNIGHT, D. *et al.* 2003, PICARD, C. *et al.* 2005) . A degradação de mucina pode também contribuir para a saúde intestinal. Quando há a quebra proteolítica da mucina, poros são formados na camada mucosa. Esta rede de poros fica repleta de produtos de degradação da mucina, como componentes orgânicos. Estes nutrientes acabam sendo utilizados pelas bactérias para suporte energético (PELASEYED, T. *et al.* 2014, KNIGHT, D. *et al.* 2003).

Além destas funções importantes para a saúde intestinal e fisiológicas, as bactérias exercem um papel crucial na produção de energia, ao passo que as enzimas humanas não digerem alguns componentes da dieta. Produtos como celulose, xilanas e amido são exemplos de produtos utilizados pelas bactérias intestinais. (VALENTINA TREMAROLI *et al.* 2012)

Papel do Intestino

No trato intestinal é provável encontrar uma grande quantidade de componentes próprios, relacionados à defesa do organismo contra microorganismos patogênicos. A barreira primária de proteção a todos estes danos sofridos pelo organismo é o muco. Este consiste de uma substância visco elástica encontrada durante todo trato intestinal, variando em sua quantidade ao longo do intestino (FIGURA 4). (JOHANSSON, M. *et al.* 2011).

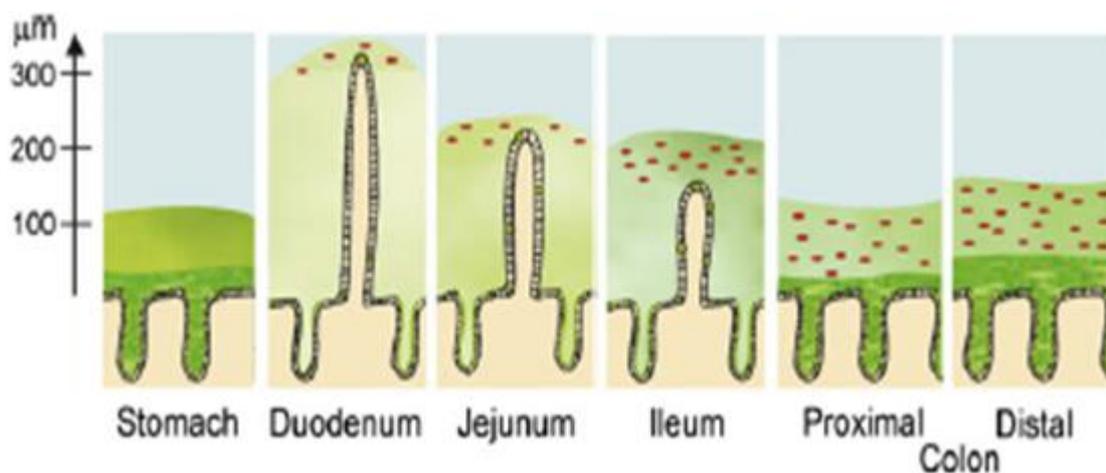


Figura 4 Característica do muco ao longo do trato gastro intestinal. Estômago (dupla camada), intestino delgado (mono camada), colon (dupla camada). (PELASEYED, T. et al. 2014)

No intestino delgado, pode-se encontrar regiões funcionais do epitélio, em relação a sua defesa. Nesta região estão localizadas as “Paneth Cells”. Estas células estão envolvidas na secreção de substâncias de defesa, bem como, lisozimas e defensinas. As Paneth Cells estão envolvidas também na atividade estimulatória de células-tronco no epitélio intestinal, através do fator de crescimento epitelial (FGE) (MOWAT, A. *et al.* 2014, CLEVERS, H. *et al.* 2013).

Outro tipo de célula encontrado no trato intestinal, nas criptas, em maior abundância no colon, são as “Goblet Cell”. Estas células estão envolvidas, mais especificamente, na produção de muco. A mucina é o componente primordial do muco, que consiste de uma região proteica, e outra região glicosídica. (PELASEYED, T. *et al.* 2014; MOWAT, A. *et al.* 2014; CLEVERS, H. *et al.* 2013)

As Goblets Cells e as Paneth Cells têm papel importante na proteção mucosa, enquanto que as Goblets Cells liberam muco constantemente próximo às criptas, há um influxo intestinal de componentes antimicrobianos. Os ATPs ficam embebidos na camada mucosa, e auxiliam na eliminação de bactérias transitórias (FIGURA 5) (MOWAT, A. *et al.* 2014).

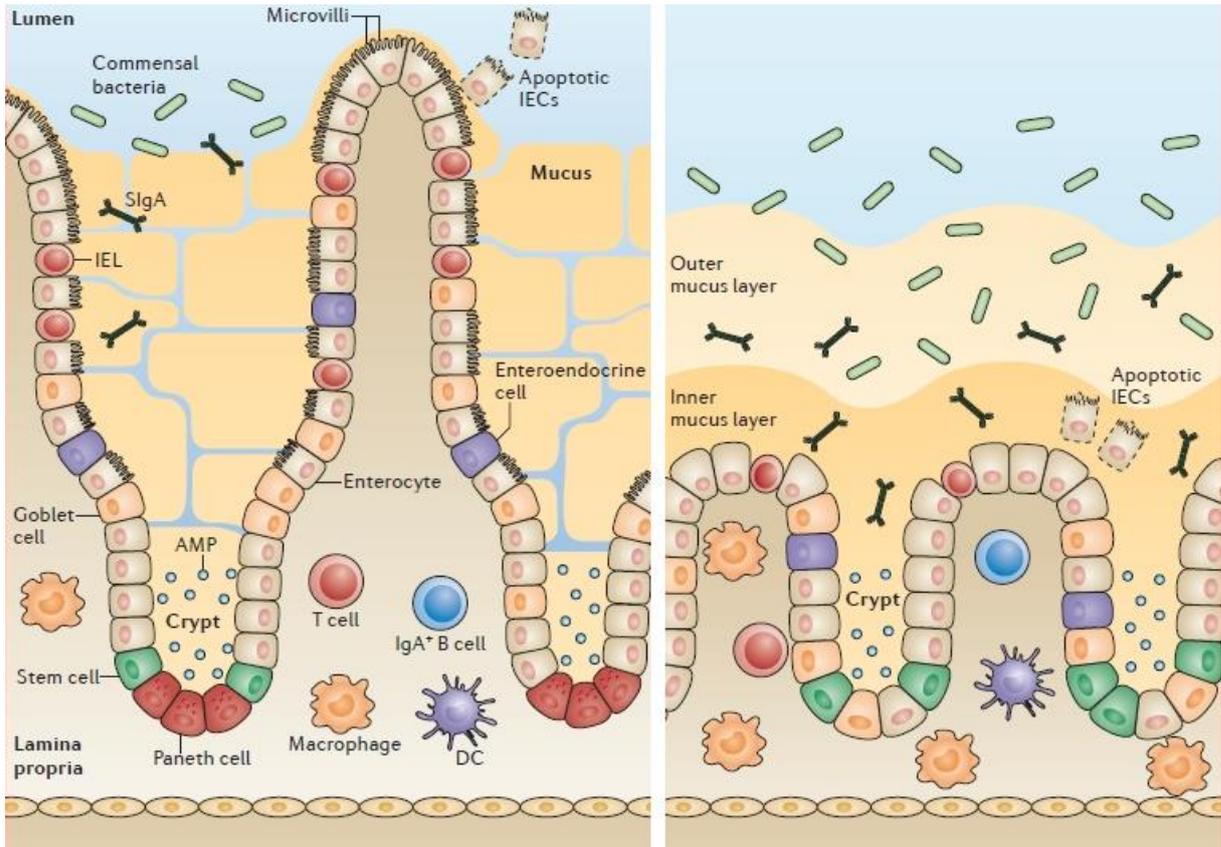


Figura 5 Estrutura e composição epitelial no intestino delgado (à esquerda) e colon (à direita). (MOWAT. AND AGACE 2014)

Diabetes tipo 1

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença conhecida por sua dependência à insulina, ocasionada pela morte seletiva das células β -pancreáticas. Estas células são especializada na produção de insulina. O DM1 aparece normalmente na infância, quando há uma predisposição genética, associada a múltiplos fatores como viroses, dieta, peso corporal, dentre outros. Estes fatores, associados à predisposição genética, pode acabar induzindo a autoimunidade das células β -pancreáticas, levando a sua destruição total, ou parcial (ONKAMO P. *et al.* 1999; GREEN A. *et al.* 2001; PIROT P. *et al.* 2008).

Esta desordem crônica, de incidência global, apresentou um aumento em meados dos anos 90, quando a incidência aumentava 2,8% ao ano. No Brasil, há uma incidência de 7,6 pessoas com DM1 a cada 100.000 indivíduos.(SIMA A. *et al.* 2010; FERREIRA S. *et al.* 1993; ABRIU N. *et al.* 2002)

Para a indução padrão ouro de diabetes tipo 1, utiliza-se a injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). Este composto caracteriza-se como um agente indutor de DM1. Este composto faz parte do grupo das glicosamina-nitrosuréia, onde, é captado pelas células via transporte de glicose por GLUT-2, muito expresso pelas células β -pancreáticas produtoras de insulina, nas ilhotas de Langerhans. Seus efeitos tóxicos são causados pela diminuição dos níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e formação de radicais livres intracelulares, ocasionando quebra nas cadeias de DNA. (SCHNEDL W. *et al.* 1994; SHAFRIR E. 1997)

Relação da diabetes tipo 1 e microbiota

O diabetes tipo 1, diferentemente do diabetes tipo 2, compreende a desordem de dependência da insulina, ocorrendo via destruição das células β -pancreáticas encontradas nas ilhotas de Langerhans. Esta destruição está relacionada com a imunidade inata e adaptativa, onde há geração de autoanticorpos (GOMES, A. *et al.* 2014; ENDESFELDER, D. *et al.* 2014).

Muitos estudos vêm tentando demonstrar a relação do diabetes tipo 1 com a integridade intestinal, tanto pela via da barreira mucosa protetora, quanto através da microbiota, As quais direta e fisicamente ligadas (SOYUCEN, E. *et al.* 2014; VIEIRA, S. *et al.* 2014; TATTOLI, I. *et al.* 2012). Esta relação entre diabetes tipo 1 e microbiota ainda não está totalmente clara. Acredita-se que o aumento da permeabilidade através das células, e por entre as células, esteja envolvido no processo. Uma dieta desbalanceada e hábitos de vida pouco saudáveis, acabam gerando alterações na barreira microbiana, levando à destruição da barreira mucosa protetora. Esta alteração mucosa é iniciada através da mudança da população bacteriana. Após a mudança de bactérias comensalistas por transitórias, começa um processo inflamatório que acaba danificando o epitélio. Este dano compromete a produção de muco e a integridade da barreira epitelial. Após a perda da integridade intestinal, o transporte de microorganismos patogênicos e endotoxinas, como LPS, torna-se mais acessível aos tecidos (FIGURA 6) (GOMES, A. *et al.* 2014; VIEIRA, S. *et al.* 2014) .

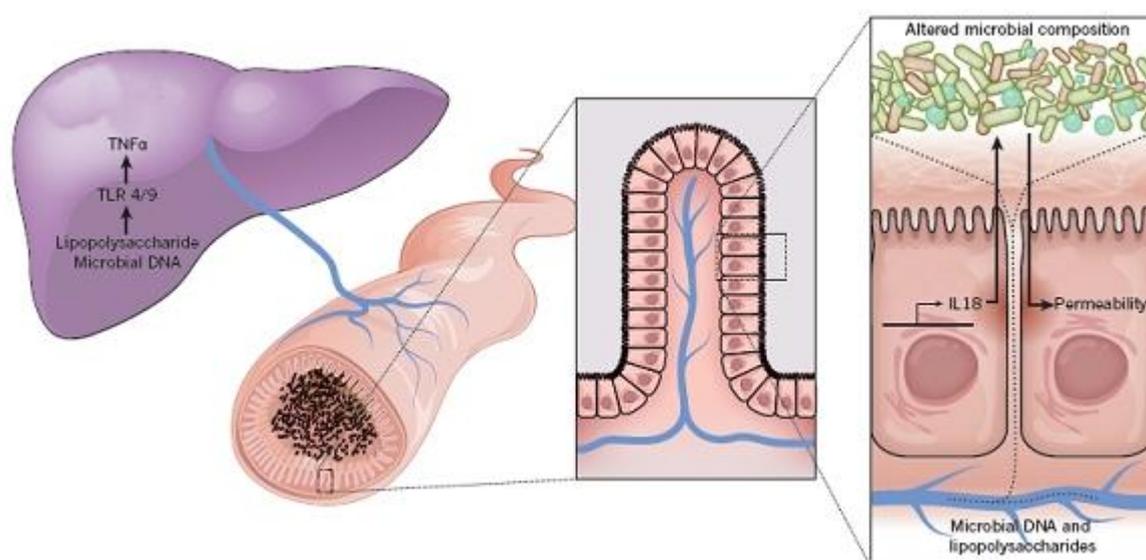


Figura 6 Desestabilização das “tight junctions”, entre as células epiteliais, resultante do processo de disbiose. (VALENTINA TREMAROLI AND FREDRIK BÄCKHED, 2012)

Estudos demonstraram que o aumento de LPS bacteriano, junto ou independente de uma dieta não balanceada, rica em gordura, está diretamente envolvido nos processos de desordens metabólicas. Estas se caracterizam por aumento de citocinas pró-inflamatórias, aumento do peso corporal, resistência à insulina, aumento de gordura subcutânea e intra-abdominal, triglicerídeos e aumento da média de captação de energia ingerida, contribuindo para a desordem metabólica no diabetes tipo 2 e influxo de componentes antigênicos. Esta última, tem como consequência, o favorecimento da autoimunidade em diabetes tipo 1 (GOMES, A. *et al.* 2014).

Esta permeabilidade de antígenos patogênicos ocorreria através da instabilidade das *Tight Junctions* (junções ocludentes) entre as células epiteliais. (BROWNLEE, L. A. *et al.* 2007; GOMES, A. *et al.* 2014) A inflamação ocasionada no DM1 pode estar ligada à fisiopatologia do processo inflamatório relacionado à permeabilidade de LPS bacteriana. A liberação de lipopolisacarídeos (LPS) por bactérias Gram-negativas no trato gastrointestinal tem consequências chave no papel inflamatório em diversas desordens metabólicas. Após sua entrada na corrente sanguínea, o LPS se liga em receptores de superfície de membrana, chamados *toll-like receptors* (TLR), mais especificamente o receptor TLR4. Esta classe de receptores, pertencente a uma grande família de receptores TLR, a qual é responsável principalmente por participar da resposta inflamatória. Estão presentes principalmente em

células do sistema imune, como monócitos e neutrófilos, mas também pode ser encontrado em adipócitos e células epiteliais. Esta família de receptores pertence a um grupo de receptores designados PAMP's, (*Padrões Moleculares Associados a Patógeno*), onde podemos encontrar também o conjunto designado NOD (*domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos*), os quais são intracelulares. Em analogia aos TLR's, que respondem a LPS de bactérias, os NOD respondem mais especificamente aos peptídeo-glicano bacteriano, desencadeando, assim, sua ação pró-inflamatória. O grupo dos NOD está presente em células epiteliais e células do sistema imune como linfócitos, macrófagos e células dendríticas. Neste grande grupo de células, que expressam os PAMP's, por sua vez, é promovida a ativação da proteína pró-inflamatória NF- κ B, a qual regula a expressão gênica em diversas ocasiões, bem como, respostas inflamatórias em diversos tecidos (CASTRO-FARIA-NETO, H. *et al.* 1997; GOMES, N. E. *et al.* 2010; MÓNICA ANDREWS *et al.* 2012). Estes mecanismos de ação (processos inflamatórios) afetariam diretamente a microbiota, alterando a permeabilidade epitelial intestinal, reduzindo o número de bactérias comensalistas e diminuindo a camada mucosa. Isto ocasionaria agressão as células pancreáticas, possibilitando também a formação de autoanticorpos, o que estaria envolvido na diabetes tipo 1 (BROWNLEE, L. A. *et al.* 2007, GOMES, A. C. *et al.* 2014, ABT, M. *et al.* 2014, ENDESFELDER, D. *et al.* 2014) .

Akkermansia muciniphila

A. muciniphila é uma bactéria do filo das *verrucomicrobias*, degradadora de mucina (mais especificamente MUC 2), uma das glicoproteínas identificadas no muco. Esta bactéria que reside na camada mucosa é do genero gram-negativa e está presente no intestino em cerca de 3 -5%. (DERRIEN, M. *et al.* 2008; TILG, H *et al.* 2014)

Um estudo publicado por EVERARD, A. *et al.* demonstra que a ingestão de um coquetel da bactéria *A. muciniphila*, melhora consideravelmente os índices de LPS, responsável por desencadear respostas inflamatórias. Junto à redução de LPS, foi observada uma redução no peso de ratos induzidos a obesidade. QIAO, Y. *et al.*, demonstraram que, pré-bióticos tendem a melhorar os índices da bactéria, reduzindo assim, a massa corporal e o LPS plasmático. O estudo realizado por EVERARD A. *et al.* , demosntrou os baixos níveis de *A. muciniphila* presentes em ratos induzidos a obesidade. Em contrapartida, os ratos que ingeriram prébioticos, apresentaram altos níveis da bactéria. Este aumento de *A. muciniphila* mostrou-se inverso ao declínio de marcadores inflamatórios expressos e receptores no fígado

(MyD88, IL-1R), tecido adiposo (CD11c) e intestinais (TRL-4 e IL-1). A correlação se mostra positiva em relação ao aumento de massa muscular e negativamente com a diminuição do ganho de peso.

Um estudo recente mostrou um possível mecanismo de ação da metformina em relação à microbiota. Neste estudo a *A. muciniphila* mostra-se pronunciadamente aumentada, após a ingestão do medicamento. Outro parâmetro a ser levado em consideração foi o aumento de células goblets nas criptas intestinais. A elevação no número de células intestinais, sugere primeiro aumento no grupo de células produtoras de muco, seguido de um aumento das bactérias degradadoras de muco. O estudo demonstrou ainda, melhora nas populações de bactérias probióticas. (SHIN N. *et al.* 2014)

Em um estudo realizado com cranberry, rico em polifenóis, utilizando ratos obesos como modelo. Observa-se que, os parâmetros bioquímicos e inflamatórios apresentam melhoras junto ao perfil microbiano, dos ratos tratados. O estudo demonstra ainda, o aumento considerável na quantidade de *A. muciniphila*, em relação ao controle. (ANHÊ F. F. *et al.* 2014)

Bacteroidetes

O filo das *Bacteroidetes* está entre os três mais abundantes na microbiota intestinal. Junto com o filo *Firmicutes* e *ActinoBactérias*, estes compõem cerca de 80% das Bactérias intestinais. As bacteroidetes apresentam como principal gênero, e mais abundante, as bacteroides. Este gênero exerce funções extremamente importantes na fisiologia intestinal. Colonizando todas as diferentes partes do TGI, apresentando resistência ao pH, nutrientes e disponibilidade de oxigênio (WHITMAN W. *et al.* 1998). Este gênero tem como uma de suas atribuições a produção de butirato, além disso está envolvida no metabolismo de ácidos biliares (KIM Y. *et al.* 2007).

As bacteroidetes também são responsáveis pela degradação de carboidratos complexos, como N-glicanos e sulfato de condroitina. (SALYERS A. *et al.* 1977). Outra contribuição do filo das bacteroidetes é a ativação do sistema imune, mediado por células T. (MAZMANIAN S. *et al.* 2008; LEY, R. *et al.* 2006)

Prevotella

A *Prevotella* é um gênero de bactéria presente no intestino, advinda do filo das bacteroidetes. (SCHER, J. *et al.* ; ZAURA E. *et al.* 2009)

Apesar de estar fortemente associada à microbiota oral, mais especificamente na região subgingival. (ZAURA E. *et al.* 2009) Os estudos sobre a bactéria divergem em relação ao seu impacto na microbiota intestinal. Muitos estudos apontam a *Prevotella* como uma das Bactérias associadas ao desequilíbrio microbial em obesos. (ZHANG H. *et al* 2009) A *Prevotella* apresenta-se aumentada em indivíduos com artrite reumatoide, como descrito por SCHER, J. *et al.* 2013, e seus níveis relacionando-se com o progresso da doença.

Ha também uma divergência em relação à associação da *Prevotella* em relação aos processos inflamatórios. Estudos publicados não chegam a um veredito sobre a participação da *prevotella* nos processos inflamatórios, e sua ação como bactéria não próbiotica. (SCHWIERTZ A. *et al.* 2010; ZHANG H. *et al.* 2009; MANICHANH C. *et al.* 2006)

OBJETIVO

Avaliar o comportamento da microbiota e as concentrações de metabólito do resveratrol gerados pelas Bactérias, após o tratamento com resveratrol, em modelo de ratos DM1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Sintetizar o metabólito dihidroresveratrol, para a utilização como padrão.
- ✚ Caracterizar o metabólito, dihidroresveratrol, através de RMN, UV e MS, após a síntese do composto;
- ✚ Identificar e quantificar as Bactérias através da técnica de PCR-RT, do filo *Bacteróide*, do gênero *Prevotella*, e a espécie *Akkermansia misciniphil*, nas fezes de ratos após o tratamento.
- ✚ Indentificar e quantificar o resveratrol e dihidroresveratrol pela microbiota, ao final do tratamento, por HPLC e MS, nas fezes após o tratamento;
- ✚ Correlacionar às quantidades de dihidroresveratrol, com as Bactérias presentes nas fezes dos ratos diabéticos e não diabéticos tratados.

JUSTIFICATIVA

A microbiota tem chamado atenção da comunidade científica atualmente, muito em virtude de seu impacto fisiológico e seu potencial modulador. Novas abordagens na literatura buscam modular a microbiota intestinal, com o objetivo de proporcionar à biota um ambiente equilibrado. Tendo em vista que o resveratrol não tem ainda um mecanismo de ação consolidado, decidimos testar este polifenol frente à microbiota. A hipótese do resveratrol modular a população bacteriana intestinal, ganha força com a grande quantidade de estudos publicados, os quais demonstram que compostos ricos em polifenóis exercem efeito modulador sobre a microbiota. Outro indicio que o resveratrol poderia estar atuando na microbiota, é o metabolito gerado pelas Bactérias intestinais, após metabolizar o resveratrol. O dihidroresveratrol é um metabolito gerado pelas Bactérias intestinais e seu monitoramento junto à microbiota é de total importância para o estudo.

Em nosso trabalho, decidimos monitorar a ação do resveratrol frente à microbiota, selecionando um filo de Bactérias extremamente importante para a biota, as *Bacteroidetes*. Selecionamos ainda uma espécie de bactéria, a *A.muciniphila*, que vem sendo bem relacionada com melhoras dos quadros metabólicos quando seus níveis encontram-se aumentados. O gênero *Prevotella*, foi selecionado como bactéria disbiótica, para demonstrar o comportamento de uma bactéria não benéfica.

Nosso estudo visa observar os efeitos do resveratrol frente a algumas populações de Bactérias intestinais. Este resultado será acompanhado das concentrações do metabolito gerado pelas Bactérias, os quais serão posteriormente analisados. Ressaltamos que esta pesquisa é de grande relevância ao passo que a microbiota necessita de agentes moduladores, e o resveratrol ainda não detem um mecanismo de ação consolidado.

CAPÍTULO 2

**ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA
MOLECULAR NUTRITION AND FOOD
RESEARCH**

1 **Resveratrol induces increased levels of *Akkermansia muciniphila* in healthy and diabetic *Wistar* rats in a non-linear**
2 **response**

3
4 Bruno Adami¹, Pamela Bagatini², Carlos Leite³, Vladimir Cantarelli⁴, Priscylla Volkart¹, Matilde Achaval², Léder
5 Xavier⁵, Helena Schirmer⁶, André Souto¹
6
7

8
9 ¹Department of Pure Chemistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

10
11 ²Department of Morphologic Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

12
13 ³Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

14
15 ⁴Department of Molecular Biology, Feevale, Novo Hamburgo, Brazil

16
17 ⁵Department of Morphologic Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

18
19 ⁶Department of Basic Health Science, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

20
21
22
23 **Correspondence:** André Souto

24
25 (arigony@pucrs.br).

26
27
28 **Keywords:** *Akkermansia muciniphila*/ Microbiota/ Resveratrol/ Type 1 Diabetes/ UPLC-MS/MS

29
30
31 **Abbreviations:** UPLC-MS/MS, Ultra-Performance Liquid Chromatography-lectrospray tandem mass spectrometry;
32 qPCR, Reaction polimerase chain in real time; HFD, high-fat diet; PCR, Polymerase Chain Reaction; STZ,
33 Streptozotocin; DM, Diabetes Mellitus; NDM, Non-Diabetic;
34
35

36
37
38 **Scope:** Studies related to the benefits of resveratrol have increased over the last decade. Along with resveratrol, another
39 growing issue in the scientific community is microbiota, and its possible modulation through compounds with prebiotic
40 action. Thus, we analyze the influence of resveratrol ingestion and its metabolite on the population of *A. muciniphila*.

41
42 **Methods and Results:** To induce intestinal dysbiosis, we used an experimental model of type 1 diabetes in rats. The
43 treatment with resveratrol was performed during thirty days with daily doses of 5, 10 and 20 mg.kg⁻¹. The quantification
44 of resveratrol and its metabolite was accomplished through UPLC-MS/MS (*Ultra-Performance Liquid Chromatography-*
45 *lectrospray tandem mass spectrometry*). *A. muciniphila* was quantified using qPCR (*Reaction polimerase chain in real*
46 *time*).

47
48
49
50 **Conclusion:** The study demonstrated a non-linear increase in the *A. muciniphila* population, in both normal and diabetic
51 rats treated with resveratrol. The metabolite presented a dose-dependent production, however, a significant increase was
52 observed in healthy animals in relation to diabetic rats.
53
54

55
56
57
58
59 **Introduction**
60

1 Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is a polyphenolic compound found in peanuts,
2 plums, grapes and their processed products, like wine [1-5]. Additionally, resveratrol shows important
3 benefits, such as: anticarcinogenic potential *in vitro*, anti-inflammatory effects [6], antioxidant and
4 cardioprotective [7,8] activities.
5

6
7 Despite its well-described benefits, the action mechanism of resveratrol is still poorly described. In
8 the last decade, several studies have been performed in an attempt to understand the biological effect and
9 the bioavailability of resveratrol in different experimental models. Preclinical and clinical studies with
10 resveratrol have shown distinct responses [9,10]. One important point is that different doses of resveratrol
11 could produce different biological effects, thus, there is no consensus in relation to the "ideal" and
12 "adequate" dose for this compound [10].
13

14
15 Some hypotheses, associating resveratrol to microbiota, could explain the effects of this
16 polyphenol. One of these is related to the fact that approximately 40% of ingested resveratrol is not
17 absorbed, but remains in the gastrointestinal tract [11]. Consequently, resveratrol could be used as substrate
18 for beneficial gut bacteria, which could explain its protective effects. Accordingly, the resveratrol
19 metabolite, dihydroresveratrol (3,4',5-trihydroxybibenzyl) is found in human feces after resveratrol
20 consumption, supporting the hypothesis this compound could be used as bacterial substrate [12]. The
21 bacterial resveratrol metabolization is characterized by hydrogenation, which is very different from the
22 resveratrol metabolization that occurs in other cells of the human body [13].
23

24
25 The modulatory effect of resveratrol in gut microbiota consists in increasing the levels of
26 commensal bacteria, which are necessary for intestinal health, and decreasing the levels of transient
27 bacteria, which may be pathogenic. Thus, resveratrol is able to reduce intestinal inflammation and maintain
28 mucosal integrity in animal models of induced colitis [14]. Furthermore, microbial modulation by
29 resveratrol has been associated with systemic effects, such as: reduced inflammation in adipose tissue and
30 decreased body weight in animals submitted to high fat diet [15].
31

32
33 One specific commensal bacterium that is attracting the attention of the scientific community is the
34 *A. muciniphila*, which is a species of the phylum *Verrucomicrobia*. It is gram-negative and is associated
35 with mucus degradation functions and immunological contribution in the gastrointestinal tract [16-18]. It is
36 probiotic, producing short-chain fatty acids, especially butyrate, propionate and acetate, and helps the
37 immunomodulatory system [19]. An increase was observed in the *A. muciniphila* population in rats which
38 received a high-calorie diet and metformin, compared to animals which only received a high-fat diet
39 (HFD). This increase was correlated with an improvement in glucose tolerance and a decrease in adipose
40 tissue inflammation [20]. The bacterium also presented a strong relation with a decrease in triglyceride
41 accumulation and an increase in insulin sensitivity after cranberry administration in HFD animals [21]. In
42 fact, *A. muciniphila* decreases inflammatory bowel aggression as well as promoting increased insulin
43 sensitivity and stimulating the production of antimicrobial peptides by intestinal epithelial cells [22]. In
44 humans, *A. muciniphila* levels strongly correlate to the metabolic health status of the subjects [23].
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 In relation to *A. muciniphila* modulation, these various effects observed in different models of
2 metabolic disorders make this bacterium an important target for the prevention of metabolic disorders. Our
3 study aimed to evaluate the influence of resveratrol on the population of *A. muciniphila*, using an
4 experimental model of streptozotocin-induced type 1 diabetes in adult *Wistar* rats.
5
6
7
8
9

10 Method

11 Materials in Study

12 The study materials included: Streptozotocin (STZ) and dihydroresveratrol (Sigma Chemical Co. USA),
13 acetonitrile and tetrahydrofuran (99% of purity- Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and methanol (99%
14 of purity- T. Baker Smith, LLC, Mexico). Cellular DNA was extracted using the Kit High Pure PCR
15 Template Preparation (Roche) and PCR reactants were used in the PCR mix Platinum SYBR Green qPCR
16 SuperMix-UDG (Invitrogen). The primers were obtained from Sintese Biotecnologia LTDA. The mass
17 analysis involved conducting Ultra-Performance Liquid Chromatography-electrospray tandem mass
18 spectrometry using the Agilent 1100 LC System (Agilent, Germany) coupled to the system 6490 Triple
19 Quadrupole System.
20
21
22

23 *Trans-resveratrol* (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene), extracted from *Polygonum cuspidatum*, was
24 purchased from Chengdu Hawk Bio-Engineering (Beijing, China) and presented >99% of purity
25 (confirmed by high performance liquid chromatography), as previously described [24]. All other chemicals
26 used were of analytical reagent grade.
27

28 Animals

29 Thirty-six male *Wistar* rats, obtained from the Center for Animal Reproduction and
30 Experimentation (CREAL) at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), aged 12 weeks at the
31 start of the experiment were used. Rats were housed in groups of three animals per cage, kept under
32 standard laboratory conditions with free access to food and water, and submitted to a 12-12 h light-dark
33 cycle (lights on 8:00 a.m. to 08:00 p.m.). The experiments were conducted in accordance with the
34 guidelines from UFRGS and were previously approved by the animal ethics committee of the same
35 institution (Protocol number 21878).
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 Study design

53 The animals were randomly divided into eight groups, as follows: non-diabetic rats treated with
54 saline: NDM+S (non-diabetic + saline, n=6); non-diabetic rats treated with three different doses of
55
56
57
58
59
60

1 resveratrol (mg per kg of body weight): NDM+RSV5 (non-diabetic + resveratrol 5 mg.kg⁻¹, n=4);
2 NDM+RSV10 (non-diabetic + resveratrol 10 mg.kg⁻¹, n=4); NDM+RSV20 (non-diabetic + resveratrol 20
3 mg.kg⁻¹, n=4), diabetic rats treated with saline: DM+S (diabetic + saline, n = 6); diabetic rats treated with
4 three different doses of resveratrol: DM+RSV5 (diabetic + resveratrol 5 mg.kg⁻¹; n=4); DM+RSV10
5 (diabetic + resveratrol 10 mg.kg⁻¹, n=4); DM+RSV20 (diabetic + resveratrol 20 mg.kg⁻¹, n=4). All groups
6 were used for the qPCR analyses. In the analyses of metabolites, only groups receiving the compound were
7 included in the analysis.
8
9
10
11

12 Induction of experimental type 1 diabetes

13
14
15 After a period of fasting overnight (6 hours), diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p.)
16 injection of STZ (65 mg.kg⁻¹ body weight) diluted in 0.1 M sodium citrate buffer (vehicle), pH 4.5. The
17 non-diabetic rats received an equivalent amount of sodium citrate buffer. After 72 h, the glucose levels in
18 blood collected from the tail of the rats were measured with a portable glucometer (On Call Plus, ACON
19 Laboratories, USA). Only the animals with blood glucose levels > 300 mg.dL⁻¹ and symptoms of polyuria
20 and polydipsia were considered diabetic and were selected for this study. During the experiment, the
21 glucose levels in the blood of all animals were checked at four different times: D1 (before i.p. injection of
22 STZ and / or vehicle), D4 (72 h after i.p. injection), D30 and D60 (Figure 1).
23
24
25
26
27
28

29 Oral treatment

30
31 From D30 to D60, all the groups underwent oral treatment between 10:00-11:00 a.m., once a day.
32 Resveratrol was solubilized in 0.9% saline solution and promptly administered by oral gavage in animals
33 belonging to the NDM+RSV and DM+RSV groups, at doses of 5 mg.kg⁻¹, 10 mg.kg⁻¹ and 20 mg.kg⁻¹.
34 Animals from the NDM+S and DM+S groups only received equal volumes of 0.9% saline solution.
35 Resveratrol was stored at 5°C in an amber vial, protected from light. The body weight of animals was
36 observed on D1, D4, D30 and D60 (Figure 1).
37
38
39
40

41 Stool collection

42
43 The stools were collected at the end of treatment and stored in sterile, amber bottles to avoid
44 degradation and isomerization of resveratrol. The feces were stored at -20°C for analyses.
45
46
47

48 DNA Detection of *A. muciniphila*

49
50 Cellular DNA was extracted using the High Pure PCR Template Preparation Kit according to the
51 protocol suggested by the manufacturers. Two μ L of the extracted DNA were used in a total volume of 25
52 μ L of PCR mix Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). The primer used to amplify
53 *A. muciniphila* was F: 5'AGGCGGAGGAAATCCTAAAA -3' and R: 5'GCGGTTGGCTTCAGATACTT
54 -3', which correspond to nucleotides 1231 - 1250 (sense) and 1395 - 1414 (accession number
55
56
57
58
59
60

1 NR_074436.1). The qPCR amplification was performed in the LightCycler 2.0 platform (Roche, Germany)
2 and the confirmation of the amplicon was done by melting curves analysis (TM 80). The specificities of
3 the primers for bacterial detection were evaluated using the BLAST search program and performed with
4 another bacterial sequences without any amplification signal. To confirm that the amplified product was
5 from *A. muciniphila*, we used an oligosequence designed according the sequence primers. It was used as
6 positive control, in each qPCR. To evaluate the bacterial concentration and the detection limit, serial
7 dilution with positive control was conducted using concentrations ranging from 10^3 to 10^7 . Negative
8 (0.9% sodium chloride) controls was used in all reactions and all samples were analyzed in triplicate.
9
10
11
12
13
14

15 **Extraction of resveratrol and dihydroresveratrol**

16 The method involved the extraction of the organic solvents tetrahydrofuran, methanol and
17 acetonitrile (30%), in the following proportion 3:3:1. From each experimental group, 50mg of fecal sample
18 were added to 800 μ L of solvent mixture and stirred in a vortex for 5 minutes.
19

20 After complete mixing, the material was centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes, the supernatant
21 was removed and the remaining fecal material was processed the same way two more times. Then,
22 supernatant from the three extractions was evaporated using nitrogen gas. The content was filtered through
23 a 0.22 μ m PVDF filter for injection in the UPLC-MS/MS.
24
25
26
27
28

29 **Analysis on UPLC-ESI(-)-MS/MS Chromatography**

30 Resveratrol and its metabolite were analyzed using UPLC 1290 coupled to 6460 triple quadrupole
31 detector from Agilent Technologies®. The analytes were detected using electrospray negative ionization
32 and multiple-reaction monitoring of the transition ions. Chromatographic separations were performed
33 using a Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 x 50 mm 1.8 μ m column. The flow rate of acetonitrile (eluent A):
34 0.2% formic acid (eluent B) mobile phase was 0.3 ml/min with a column temperature of 40°C. An
35 increasing gradient of eluent A was used, starting at 5% for 0-2 min, 5-15% for 2-7 min and 15-50% for 7-
36 15 min. Five microliters of samples was injected into the UPLC system.
37
38
39
40
41
42

43 **Mass Spectrometry**

44 The capillary voltage was 2500V, the nebulizer gas flow was 10 L/min at a pressure of 35 psi and a
45 temperature of 300°C. In relation to MS/MS parameters, the collision energies were optimized using Mass
46 Hunter Optimizer software interfacing with the device. In resveratrol, the collision energy was 14 V for
47 transition 227 > 185 (quantifier) and 20 V for 227 > 142.2 (qualifier). In dihydroresveratrol metabolite, the
48 collision energy was 10 V for transition 229/123 (quantifier) and 22 V for 229 > 81.0 (qualifier). An
49 internal standard trans-[13-C6] resveratrol was used as quantifier and qualifier. Resveratrol and
50 dihydroresveratrol quantification was performed using TIC chart (*Total Ion Chromatography*) in which
51 MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) is used to demonstrate the transitions.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Statistical Analysis

Glycaemia and body mass were evaluated using analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, the bacterial count was evaluated using Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls post-test. Metabolite and resveratrol quantification were evaluated using the Mann-Whitney test, while the Spearman test was used to analyze the correlation between bacteria levels and resveratrol metabolite levels. Statistical difference was considered significant when $p < 0.05$. The statistical analysis was conducted using SPSS Statistics 17.0 software.

Results

Glycaemia and body weight

On day 1 (D1), there was no significant difference in glycaemia or body weight between the groups. From D4 onward, the animals from the DM groups presented typical diabetes symptoms, including blood glucose levels exceeding 300 mg/dL, polyuria and polydipsia (Table 1).

Chromatography and Mass Spectrometry

Resveratrol and its metabolite were analyzed by UHPLC, and the chromatograms of the samples are shown in Figure 2. The standards of compounds were determined by the chromatographic peaks of the fecal samples. It was clear that peaks 1 and 2 with retention times (T_r) of 10.3 and 11.8 min were of dihydroresveratrol and resveratrol respectively. The scan of the total ion chromatography demonstrated the molecular ion (Figure 3). The negative electrospray mass spectrum of resveratrol ($T_r = 11.8$ min) showed an $[M-H]^-$ ion at m/z 227. The CID spectrum of m/z 227 generated a fragment ion at 185, the subsequent fragment showed the m/z 143.2. The negative electrospray mass spectrum of dihydroresveratrol ($T_r = 10.3$ min) showed an $[M-H]^-$ ion at m/z 229. The CID spectrum of m/z 229 generated a fragment ion at 123.0, the subsequent fragment showed the m/z 81.3. Mass spectrum analysis showed the transitions of the precursor ion to ion product, using MRM analysis.

Quantification of resveratrol and dihydroresveratrol

Quantification of the resveratrol ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) eliminated in the feces of the animals showed no significant difference between the groups (Figure 4B).

Increases in resveratrol doses produced higher levels of dihydroresveratrol in healthy and diabetic animals. However, the DM groups treated with resveratrol presented low levels of dihydroresveratrol when compared to healthy animals treated with the same doses of resveratrol (Figure 4A).

Quantification of the *A. muciniphila*

1 The quantification of *A.muciniphila* (16S rRNA gene) demonstrated that resveratrol treatment
2 increased the levels of this bacteria in groups NDM+RSV5, NDM+RSV20 when compared to NDM+S
3 group ($p<0.001$). In diabetic animals, groups DM+RSV5 and DM+RSV10 presented a significant increase
4 in the *A. muciniphila* population in relation to the DM+S group ($p<0.001$) (Figure 5).
5
6

7 8 9 **Correlation between *A. muciniphila*, resveratrol and dihydroresveratrol**

10 The Spearman test showed no correlation between *A. muciniphila* levels and dihydroresveratrol in
11 the non-diabetic animals (figure 6A). In the diabetic animals the correlation was significant and negative (r
12 = -0.74) (Figure 6B).
13
14

15 16 17 18 **Discussion**

19 Type 1 diabetic rats present an increased intestinal dysbiosis characterized by commensal intestinal
20 bacteria reduction coupled with the growth of, pathogenic or non-pathogenic, transient bacteria [25-27]. Resveratrol
21 treatment was unable to normalize glycemic levels and body weight in diabetic animals. These results are in
22 accordance with previous studies [28-30].
23
24

25 In our study, we observe that resveratrol induces a non-linear increase in the *A. muciniphila* population in
26 normal and diabetic rats. Other studies have shown that resveratrol treatment promotes changes in gut microbiota
27 through an increase in probiotic bacteria, followed by a decrease in bacteria that can initiate dysbiosis
28 [14,15,31,32]. Additionally, cardio protector activity induced by altered microbiota has been described after
29 resveratrol administration [33]. However, these results do not demonstrate a direct effect of resveratrol on *A.*
30 *muciniphila*.
31
32

33 The main goal of our study was to evaluate *A. muciniphila*, because the use of prebiotic agents improves
34 intestinal health and is associated with an increase in this bacterial population [19]. High levels of *A. muciniphila*
35 in the gut promote a reduction in inflammation and in adipose tissue in rats [34]. By contrast, a low level of *A.*
36 *muciniphila* is associated with inflammation in obesity and diabetic models [35,36]. Another important function of
37 *A. muciniphila* is the fermentation of vital compounds, not digestible by human gut, like short-chain fatty acids
38 (SCFA). These molecules stimulate insulin release and immune system recruitment [22,34]. Thus, our results are in
39 accordance with previous studies that show microbial modulation, based mainly on *A. muciniphila* evaluation [34-
40 36].
41
42

43 The non-linear response we obtained has been demonstrated in other inquiries. Different dosages of
44 resveratrol are able to produce different responses in gut microbiota populations [14,15,31]. It was also
45 demonstrated that smaller dosages of resveratrol were able to ameliorate some aspects of colon cancer induced by
46 hyper caloric diet in rats, in a non-linear response [33]. Our results demonstrate this non-linear relationship and
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 we suppose that it may be related to the outcome of a series of complex interactions happening
2 simultaneously in the intestinal microbiota.
3

4
5 To the best of our knowledge, no previous study has attempted to determine the concentration of
6 dihydroresveratrol in feces after resveratrol treatment in a rat model. In general, the existing studies into resveratrol
7 metabolites focus on pharmacokinetics [32] and metabolism [13]. An exception is a study, involving healthy
8 subjects, that shows a connection between resveratrol metabolite concentration and changes in microbiota [12].
9

10
11 Our group was the first to analyze the concentration of this metabolite, in the feces of healthy and diabetic
12 animals. We observed the healthy animals presented more dihydroresveratrol in their feces than the diabetic rats.
13 As expected, increases in resveratrol dosages promote a higher dihydroresveratrol concentration; that is more
14 pronounced in healthy animals.
15

16
17 The smaller dihydroresveratrol assembly found in diabetic animals, in relation to healthy rats, may be
18 explained by the fact diabetes promotes dysbiosis, reducing some bacteria in normal microbiota and increasing the
19 concentration of transitional bacteria.
20

21
22 The healthy gut microbiota in normal animals is capable of more thoroughly metabolizing resveratrol and
23 transforming it into dihydroresveratrol than that of diabetic rats.
24

25
26 While no correlation between dihydroresveratrol and bacteria levels was found in the normal animals, the
27 diabetic animals showed a significant negative correlation. These findings may be linked to the concept that higher
28 levels of *A. muciniphila* are not related to resveratrol metabolism, as no proportional relationship between the
29 normal and diabetic rats was identified.
30
31
32
33
34
35
36
37

38 Conclusion

39
40 The evidence shown in this study suggests that resveratrol treatment can promote a non-linear increase in
41 the population of *A. muciniphila* in both healthy and diabetic *Wistar* rats. This change in the microbiota is probably
42 related to the benefits of resveratrol previously described in several other studies. We also observe healthy rats
43 metabolize resveratrol into dihydroresveratrol more efficiently than diabetic rats.
44
45
46
47
48
49
50

51 Acknowledgments

52
53 This study was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq),
54 *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Fundação de Amparo a Pesquisa do*
55 *Rio Grande do Sul* (FAPERGS). LLX, M.A and AAS are CNPq researchers.
56
57
58
59
60

References

1. Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1992;**43**(1):49-52.
2. Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr*. 2002;**132**:257-260.
3. Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Berenguer T, Jakszyn P, Martínez C, et al. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *Br J Nutr*. 2008;**100**(1):188-96.
4. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;**275**:218-220.
5. Martelo-Vidal MJ, Vazquez M. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*. 2014;**158**:28-34.
6. Fremont L. Minireview - Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*. 2000;**66**(8):663-73.
7. Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998;**76**(2):270-6.
8. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006;**5**(6):493-506.
9. Visioli F. The resveratrol fiasco. *Pharmacological Research*. 2014;**90**:87-.
10. Park EJ, Pezzuto JM. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2015;**1852**:1071-1113.
11. Queipo-Ortuno MI, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, et al. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;**95**(6):1323-34.
12. Bode LM, Bunzel D, Huch M, Cho GS, Ruhlmann D, Bunzel M, et al. In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2013;**97**(2):295-309.
13. Wang D, Zhang Z, Ju J, Wang X, Qiu W. Investigation of piceid metabolites in rat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2011;**879**(1):69-74.
14. Larrosa M, Josefa Yanez-Gascon M, Victoria Selma M, Gonzalez-Sarrias A, Toti S, Joaquin Ceron J, et al. Effect of a Low Dose of Dietary Resveratrol on Colon Microbiota, Inflammation and Tissue Damage in a DSS-Induced Colitis Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;**57**(6):2211-20.

- 1 15. Qiao Y, Sun J, Xia S, Tang X, Shi Y, Le G. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage
2 in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food & Function*. 2014;**5**(6):1241-9.
- 3 16. Joyce SA, Gahan CGM. The gut microbiota and the metabolic health of the host. *Current Opinion*
4 *in Gastroenterology*. 2014;**30**(2):120-7.
- 5 17. Png CW, Linden SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI. Mucolytic Bacteria
6 With Increased Prevalence in IBD Mucosa Augment In Vitro Utilization of Mucin by Other
7 Bacteria. *American Journal of Gastroenterology*. 2010;**105**(11):2420-8.
- 8 18. Vigsnaes LK, Brynskov J, Steenholdt C, Wilcks A, Licht TR. Gram-negative bacteria account for
9 main differences between faecal microbiota from patients with ulcerative colitis and healthy
10 controls. *Benef Microbes*. 2012;**3**(4):287-97.
- 11 19. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB. Cross-talk between
12 *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of*
13 *the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;**110**(22):9066-71.
- 14 20. Shin N-R, Lee J-C, Lee H-Y, Kim M-S, Whon TW, Lee M-S, et al. An increase in the
15 *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in
16 diet-induced obese mice. *Gut*. 2014;**63**(5):727-35.
- 17 21. Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonne S, Matamoros S, Varin TV. A polyphenol-rich cranberry
18 extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in
19 association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*.
20 2015;**64**(6):872-83.
- 21 22. Everard A, Delzenne N, Cani P. *Akkermansia muciniphila*: Une nouvelle bactérie jouant un rôle clé
22 dans la fonction barrière de l'intestin, l'inflammation et les désordres métaboliques associés à
23 l'obésité ? *Diabetes & Metabolism*. 2012;**2**: 24.
- 24 23. Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N. *Akkermansia muciniphila* and improved
25 metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness
26 and ecology. *GUT*. 2015;**64**.
- 27 24. Souto AA, Carneiro MC, Seferin M, Senna MJH, Conz A, Gobbi K. Determination of trans-
28 resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *Journal of Food Composition and*
29 *Analysis*. 2001;**14**(4):441-5.
- 30 25. Tai N, Wong FS, Wen L. The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes
31 mellitus and obesity. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2015;**16**(1):55-65.
- 32 26. Wirth R, Bodi N, Maroti G, Bagyanszki M, Talapka P, Fekete E. Regionally Distinct Alterations in
33 the Composition of the Gut Microbiota in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Plos One*.
34 2014;**9**(12).
- 35 27. Yang C, Fei Y, Qin Y, Luo D, Yang S, Kou X, Zi Y, Deng T, Jin M. Bacterial Flora Changes in
36 Conjunctiva of Rats with Streptozotocin-Induced Type I Diabetes. *PLoS One*. 2015 Jul 15;**10**(7)
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
28. Bagatini PB, Xavier LL, Neues LT, Saur L, Barbosa S, Baptista PPA. Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats. *Brain Research*. 2014;**1592**:101-12.
 29. Jing Y-H, Chen K-H, Yang S-H, Kuo P-C, Chen J-K. Resveratrol ameliorates vasculopathy in STZ-induced diabetic rats: role of AGE-RAGE signalling. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*. 2010;**26**(3):212-22.
 30. Ates, O., Cayli, S.R., Yucel, N., Altinoz, E., Kocak, A., Durak, M.A., Turkoz, Y., Yologlu, S., 2007. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Clin. Neurosci.: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 14 (3), 256–260
 31. Etxebarria U, Arias N, Boqué N, Macarulla MT, Portillo MP, Martínez JA, Milagro FI. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *J Nutr Biochem*. 2015 Jun;**26**(6):651-60.
 32. Moreno-Indias I, Sanchez-Alcoholado L, Perez-Martinez P, Andres-Lacueva C, Cardona F, Tinahones F. Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food & Function*. 2016;**7**(4):1775-87.
 33. Chen M, Yi L, Zhang Y, Zhou X, Ran L, Yang J, Zhu J, Zhang Q, Mi M., 2016. Resveratrol Attenuates Trimethylamine-*N*-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. *mBio*, vol. 7 no. 2e02210-15.
 34. Marc S, Amandine E, Alicia G-V, Sébastien M, Sara R, Nathalie M D, Ramon G, Marc C and Patrice D C *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*; v 05: p.31:25.
 35. Baldwin J, Collins B, Wolf PG, Martinez K, Shen W, Chuang CC, Zhong W, Cooney P, Cockrell C, Chang E, Gaskins HR, McIntosh MK. Table grape consumption reduces adiposity and markers of hepatic lipogenesis and alters gut microbiota in butter fat-fed mice. *J Nutr Biochem*. 2015 v. 27: p.123-35.
 36. Moran Y, Mi Y L, Hyun S Yu, Timothy L T, Joonhon S, Yun-Mi S, Kayoung L, Eric A F, Xochitl C M, Dirk G, Eric S L, Ramnik J X, Bruce W B, Gwang P K, and Curtis H Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes. *Genome Med.*; 2016 ,v. 8: p. 17.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

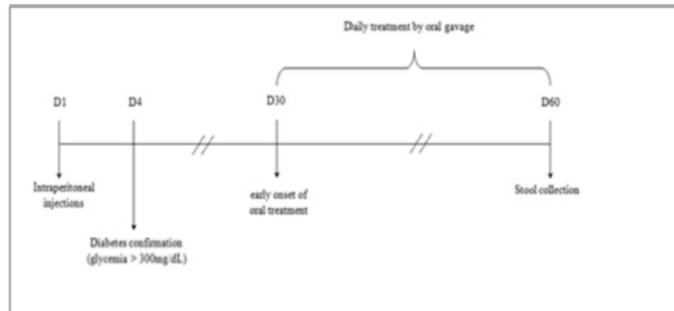


Figure 1 Study design.

120x55mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

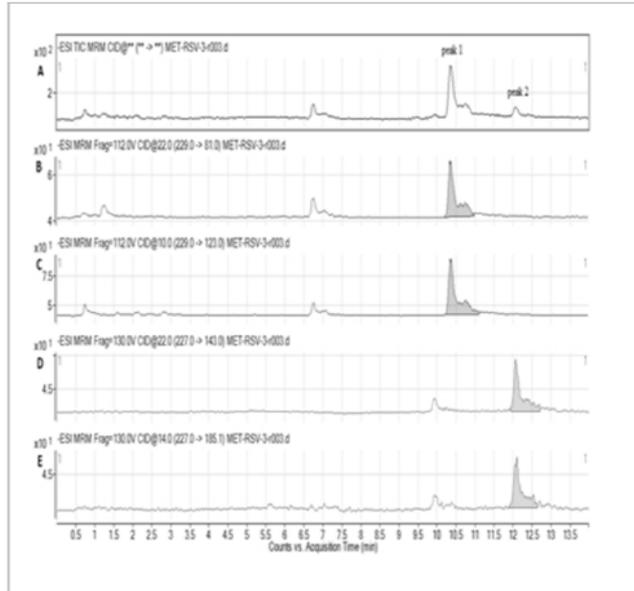


Figure 2- (A) TIC demonstrating the chromatographic peaks of dihydroresveratrol (peak 1) and resveratrol (peak 2). MRM Showing the quantifier and qualifier fragments of dihydroresveratrol (B, C) and resveratrol (D, E).

113x106mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

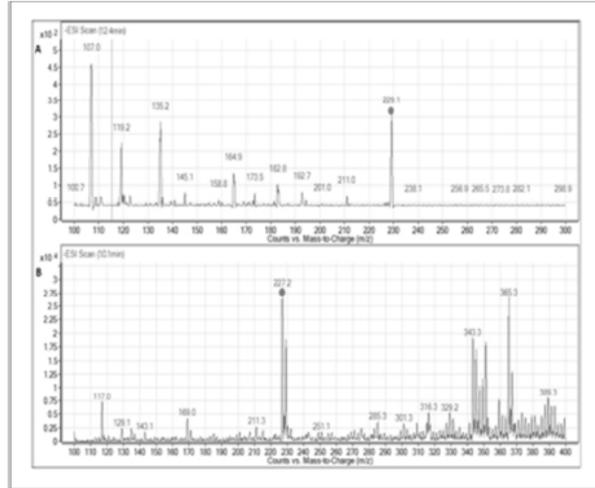
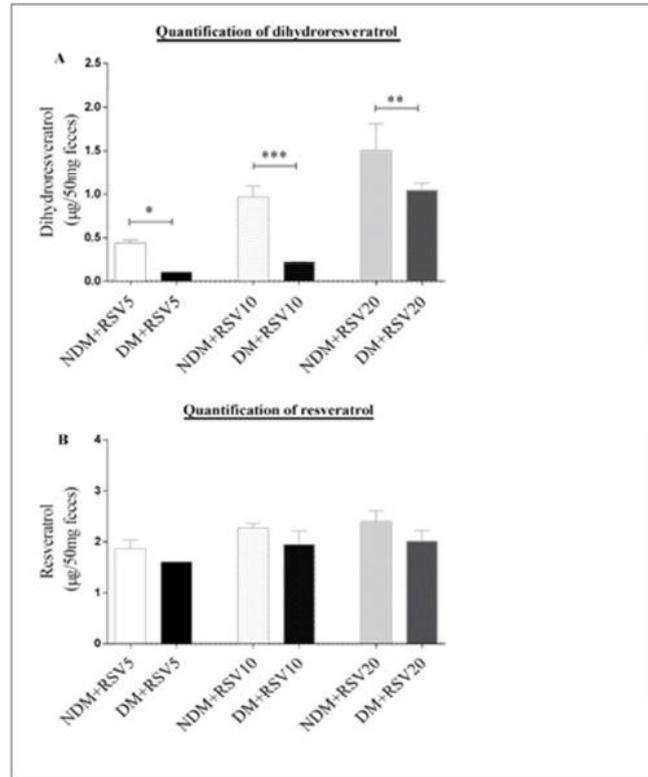


Figure 3- Full scan showing the molecular dihydroresveratrol (A) and resveratrol (B) ions.

106x87mm (96 x 96 DPI)



42 Figure 4 - Quantification of resveratrol (A) and dihydroresveratrol (B). NDM + S (non-diabetic + saline);
43 NDM + RSV5 (non-diabetic + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); RSV10 NDM + (non-diabetic + resveratrol 10 mg.kg⁻¹);
44 RSV20 NDM + (non-diabetic + resveratrol 20mg.kg⁻¹); (Mean + SD). p <0.05 = * P <0.01 ** = p
45 <0.001 = ***.

46 115x139mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

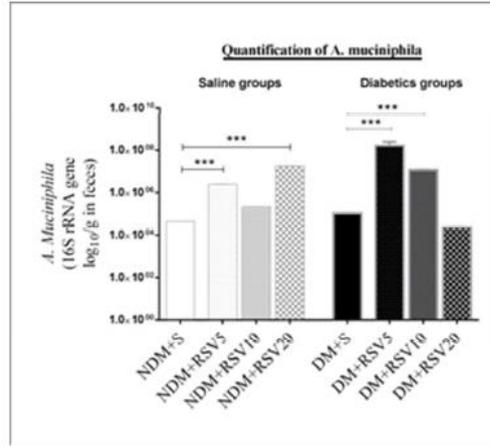


Figure 5 - Quantification of *A. muciniphila* in healthy and diabetic animals: NDM + S (non-diabetic + saline); NDM + RSV5 (non-diabetic + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); RSV10 +NDM (non-diabetic + resveratrol 10 mg.kg⁻¹); RSV20 + NDM (non-diabetic + resveratrol 20mg.kg⁻¹); DM + S (diabetic + saline); DM + RSV5 (Diabetic + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); DM + RSV10 (Diabetic + resveratrol 10 mg.kg⁻¹); RSV20 (Diabetic + resveratrol 20mg.kg⁻¹); (Mean + SD). $p < 0.001 = ***$.

87×80mm (96 × 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

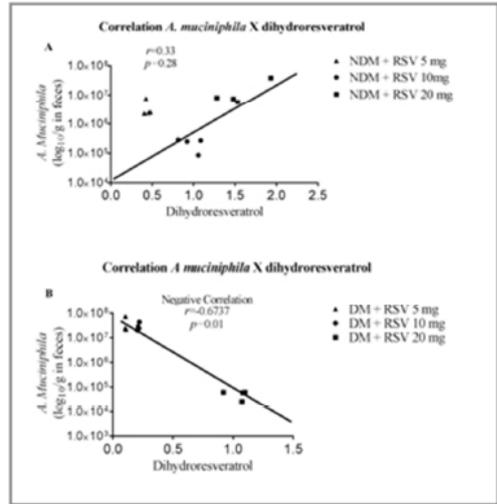


Figure 6- Correlation between *A.muciniphila* and dihydroresveratrol in healthy (A) and diabetic (B) animals.

87x90mm (96 x 96 DPI)

Table I- Glycaemia and Body Weight (BW)

Groups/Day	D1		D4		D30		60	
	Glycaemia	BW	Glycaemia	BW	Glycaemia	BW	Glycaemia	BW
	(mg.dl ⁻¹)	(g)	(mg.dl ⁻¹)	(g)	(mg.dl ⁻¹)	(g)	(mg.dl ⁻¹)	(g)
NDM+S	89.1±4.1	392.0±23.0	88.6±4.5	380.3±59.9	88.0±10.8	434.7±29.6	83.0±9.8	478.7±20.0
DM+S	81.0±4.2	373.0±24.0	321.5±2.1	337.0±24.0	510.5±91.2	313.0±24.0	458.5±44.5	304.0±19.8
NDM+RSV5	75.3±6.5	400.0±51.4	82.3±8.7	422.7±46.9 ^a	81.0±1.0	464.0±63.2 ^a	78.6±12.2	500.7±51.9 ^a
NDM+RSV10	91.0±8.0	375.0±15.5	86.6±7.5	406.7±29.9 ^a	89.3±17.0	454.0±39.8 ^a	88.0±9.8	492.7±43.7 ^a
NDM+RSV20	93.3±7.0	385.3±26.8	91.6±5.8	407.3±23.0 ^a	94.3±15.3	454.0±39.8 ^a	90.3±5.6	550.7±11.0 ^a
DM+RSV5	93.3±7.0	386.0±5.6	327.5±28.9 ^a	321.0±4.2	555.5±62.9	303.0±15.5	439.5±22.7	273.0±49.5
DM+RSV10	90.5±9.1	389.3±13.0	309.0±1.4 ^a	359.0±9.8	397.0±1.4 ^a	339.0±12.7	476.5±86.9	313.0±35.3
DM+RSV20	84.5±4.9	342.0±2.8	309.0±15.5 ^a	292.0±33.9	492.0±1.2 ^a	256.0±22.6	522.0±33.9	241.0±38.1

Table 1 – NDM+RSV5 (Non diabetic + resveratrol 5 mg.kg-1), NDM+RSV10 (Non diabetic + resveratrol 10 mg.kg-1), NDM+RSV20 (Non diabetic + resveratrol 20 mg.kg-1), DM+RSV5 (diabetic + resveratrol 5 mg.kg-1), DM+RSV10 (diabetic + resveratrol 10 mg.kg-1), DM+RSV20 (diabetic + resveratrol 20 mg.kg-1).

a= p <0.001 when compared to the same group in D1

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA, RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E SOLVENTES

A estreptozotocina (STZ) foi obtida a partir de Sigma Chemical Co. (EUA). A acetonitrila e o tetrahidrofurano, 99% de pureza, foram adquiridos através da Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha. O metanol, 99% de pureza, foi obtido através do laboratório de T. Baker Smith, LLC, México. O DNA celular foi extraído utilizando o kit de PCR Template Prepare high pure (Roche) e os reagentes de PCR foram usadas mistura da PCR platina SYBR Green qPCR SuperMix UDG-(Invitrogen). Os primers foram obtidos a partir Sintese Biotecnologia Ltda. A análise de massa e cromatográfica, ocorreu equipamentos de Agilent 1100 LC Sistema (Agilent, Alemanha) acoplado ao sistema 6490 Triplo Quadrupolo Sistema da Agilent.

Trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), foi adquirido a partir de Chengdu Falcão Bio-Engineering (Pequim, China) e apresentaram > 99% de pureza (confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência) (SOUTO A. *et al.*2001) . Todos os outros produtos químicos usados eram de qualidade de reagente analítico.

SINTESE DO DIHIDRORESVERATROL

A reação de hidrogenação do resveratro foi realizada utilizando-se 500 mg de substrato do mesmo. O polifenol foi conduzido a um reator de 250ml, onde, foi adicionado 50 mg de Pd/C. O paladium serviu como superfície de contato para o hidrogênio. A seguir, foi adicionado 50ml de EtOH, na qual, serviu como solvente para reação. O hidrogênio foi adicionado posteriormente a uma pressão de 30 PSI, após a saturação com a pressão adequada, o reator foi mantido sob agitação continua durante 12 horas, em temperatura ambiente.

A reação foi acompanhada através de cromatografia camada delgada (CCD). O produto obtido foi filtrado, em seguida foi evaporado em rotavapor. Após a evaporação, foi utilizado filtros 0,4µm, a fim de retirar material particulado. O produto final foi colocado em um dessecador para retirar e adsorver a umidade.

ULTRAVIOLETA

Para caracterização da molécula, foi primeiramente realizada uma análise em ultravioleta. Esta análise serviu para a distinção do produto de partida resveratrol, do nosso produto final dihidroresveratrol. O intuito desta análise, foi discriminar o comprimento de onda Máximo absorvido pela molécula. Para esta análise, foi realizada uma alicuota de 10 ml do produto de síntese. Para esta alicuota foi utilizado acetonitrila 30% v/v, e o produto foi diluído até a concentração de 10 ppm. Análise ocorreu em aparelho Paker Elmer de ultravioleta, onde foi realizado o scaneamento total, na faixa UV, para ver onde o composto tem sua maior absorção.

ESPECTROMETRIA DE MASSA

Análise de massas ocorreu em um aparelho Agilent 1100 LC System (Agilent, Germany), acoplado ao sistema 6490 Triple Quadrupole System da Agilent. Os parâmetros de MS/MS, ou seja, as energias de colisão, e a faixa de massa, foram otimizadas utilizando o software Mass Hunter Optimizer com interface ao aparelho. Para a distinção entre a massa do produto de partida, o resveratrol, e o produto final, foi utilizado um padrão de resveratrol (Merck). A massa dos íons moleculares foi obtida através do primeiro quadropolo do aparelho. Os fragmentos foram obtidos a partir do segundo quadropolo, onde, obtínhamos um aumento na especificidade da análise. Para determinação do íon molecular foi utilizada análise de massa, full scan, em *total ion chromatography* (TIC). Os fragmentos, ou seja, os íons produtos, foram determinados através do *multiple reaction monitoring* (MRM).

Massa do resveratrol: 230 Íon molecular: 229⁻ Fragmentos: 229/123 - 229/81;

Massa do dihidroresveratrol: 228 Íon molecular: 227⁻ Fragmentos: 227/185 – 227/142;

Após a otimização, os fragmentos serão comparados com os relatos de fragmentos já encontrados na literatura. Para a realização da análise, foi utilizado acetonitrila 30% v/v, e o produto foi diluído até a concentração de 10 ppm.

RMN (Ressonância magnética nuclear)

A amostra sintetizada foi submetida a análise de ressonância magnética nuclear, em um espectrometro, Bruker 500 MHz. A amostra foi dissolvida em metanol deuterado, em seguida, a solução foi analisada em RMN de hidrogênio e carbono 13, em frequência de 500MHz. A quantidade de amostra utilizada para realização da solução foi 10mg do produto sintetizado.

ANIMAIS

Trinta e seis ratos Wistar machos, obtidos a partir do Centro de Reprodução Animal e Experimentação (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foram utilizados com idades entre 12 semanas no início do experimento. Os ratos foram alojados em grupos de três animais por gaiola, mantidos sob condições padrão com livre acesso a comida e água, e submetidos a 12-12 h ciclo claro-escuro (luzes acesas 08h00 - 20:00). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da UFRGS e foi previamente aprovado pelo comitê de ético animal da mesma instituição (protocolo número 21878).

DESENHO DO ESTUDO

Os animais foram aleatoriamente divididos em oito grupos, como se segue: ratos não diabéticos tratados com solução salina: NDM + S (não-diabético + solução salina, n = 6); ratos não diabéticos tratados com três doses diferentes de resveratrol (mg por kg de peso corporal): NDM + RSV5 (não-diabética+resveratrol 5 mg.kg-1, n = 4); NDM + RSV10 (não-diabética+resveratrol 10 mg.kg-1, n = 4); NDM + RSV20 (não-diabética+resveratrol 20 mg.kg-1, n = 4), os ratos diabéticos tratados com solução salina: DM + S (diabética+soro, n = 6); ratos diabéticos tratados com três doses diferentes de resveratrol: DM + RSV5 (diabética+resveratrol 5 mg.kg-1; n = 4); DM + RSV10 (diabética+resveratrol 10 mg.kg-1, n = 4); DM + RSV20 (diabético+resveratrol 20 mg.kg-1, n = 4)(TABELA 2). Todos os grupos foram utilizados para as análises de PCR. Nas análises de metabolitos, apenas os grupos que receberam o composto foram incluídos na análise.

TRATAMENTO ORAL

A partir de D30 a D60, o tratamento oral foi desenvolvido em todos os grupos, entre 10:00-11:00 hora da manhã, uma vez por dia, durante 30 dias. O resveratrol foi solubilizada em solução salina a 0,9% e administrado prontamente por gavagem nos animais pertencentes aos grupos DM + RSV e NDM + RSV, em doses de 5 mg.kg⁻¹, 10 mg.kg⁻¹ e de 20 mg.kg⁻¹. Os animais do NDM + S e grupos DM + S só receberam volumes iguais de solução salina a 0,9%. O resveratrol foi armazenada a 5 ° C em um frasco de âmbar, ao abrigo da luz. O peso corporal dos animais foi observado em D1, D4, D30 e D60.

INDUÇÃO AO DIABETES TIPO 1

Após um período de jejum durante a noite (6 horas), a diabetes foi induzida por uma única injeção intraperitoneal (ip), a injeção de STZ (65 mg, kg⁻¹ de peso do corpo) diluído em tampão de 0,1 M de citrato de sódio (veículo), pH 4,5. Os ratos não diabéticos receberam uma quantidade equivalente de tampão de citrato de sódio. Após 72 h, os níveis de glicose no sangue colhido a partir da cauda dos ratos foram medidos com um glucómetro portátil (On Call Além disso, ACON Laboratories, EUA). Apenas os animais com níveis de glicose no sangue > 300 mg.dL⁻¹ e sintomas de poliúria e polidipsia foram considerados diabéticos e foram selecionados para este estudo. Durante a experiência, os níveis de glicose no sangue de todos os animais foram observados em quatro momentos diferentes: D1 (antes da injeção ip de STZ e / ou veículo), D4 (72 h após a injeção ip), D30 e D60 (**FIGURA 7**).

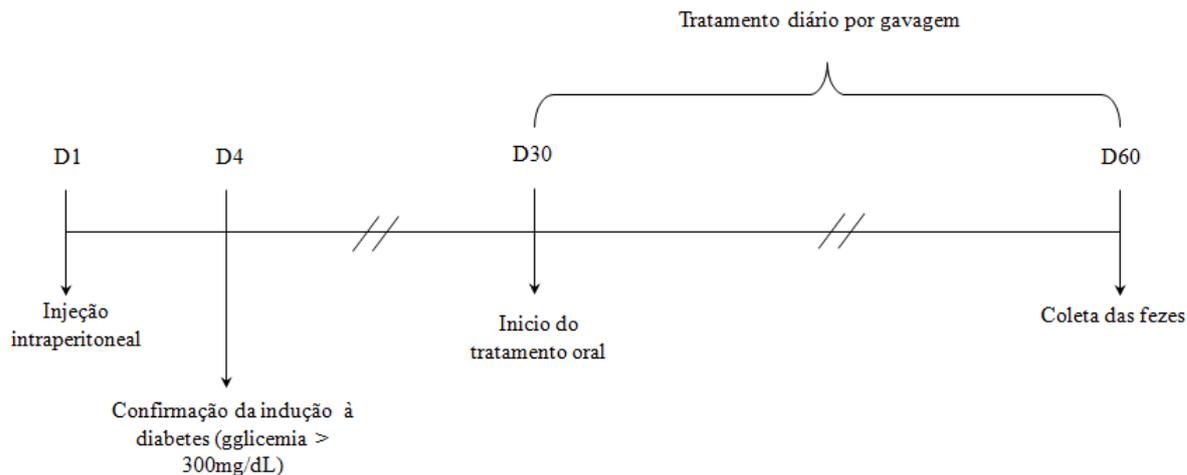


Figura 7 Cronologia do processo de indução, tratamento e coleta das fezes.

COLETA DAS FEZES

A coleta de fezes foi realizada no último dia de tratamento. A coleta foi realizada em frascos esterilizados e âmbar para evitar a degradação e de isomerização de resveratrol. As fezes foram armazenadas a -20°C .

EXTRAÇÃO DO RESVERATROL E METABÓLITOS DO RESVERATROL

O método envolve a extração dos solventes orgânicos tetra-hidrofurano, metanol e acetonitrilo (30%), em iguais proporções. Foram utilizados 50 mg de amostra fecal a partir de cada grupo experimental, Foi adicionando 800 ul da mistura dos solventes, e submetido a agitação em vortex durante 5 minutos. Após mistura completa, o material foi centrifugado a 4000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o material fecal restante foi processada da mesma forma mais duas vezes. Depois de recolher o sobrenadante das três extracções, evaporou-se utilizando nitrogenio gasoso. O conteúdo foi filtrado através de um filtro de PVDF de 0,22 μm injectável em UPLC-MS / MS.

Detecção de DNA das Bactérias

O DNA celular foi extraído utilizando o kit de PCR de High Pure Tamplate de acordo com o protocolo sugerido pelos fabricantes. Dois μL do DNA extraído foram utilizados num volume total de $25\mu\text{L}$ de mistura de PCR platina SYBR Green qPCR SuperMix UDG- (Invitrogen). A amplificação qPCR foi realizado na plataforma LightCycler (Roche, Alemanha) e a confirmação do fragmento amplificado foi feita por análise de curvas de fusão. As especificidades dos primers (TABELA 1) para a detecção de Bactérias foram avaliadas pelo programa de pesquisa BLAST. O controle negativo (cloreto de sódio a 0,9%) e os controlos positivos (de acordo com o desenho oligosequence a sequência dos iniciadores) foram usadas em cada qPCR.

Tabela 1– Primers, (F)Faward- Iniciação, (R)Reverse- Reverso;

Bactéria	Primer
<i>Akkermansia muciniphila</i>	F: 5' AGGCGGAGGAAAATCCTAAAA -3' R: 5'GCGGTTGGCTTCAGATACTT -3'
<i>Bacteroidetes</i>	F 5' - GAGAGGAAGGTCCCCAC -3' R 5' - CGCTACTTGGCTGGTTCAG -3'
<i>Prevotella</i>	F 5' -GGTTCTGAGAGGAAGGTCCCC-3' R 5' -TCCTGCACGCTACTTGGCTG-3'

ANÁLISE EM HPLC E UPLC-MS/MS

UPLC-ESI(-)-MS/MS Chromatography

O resveratrol e seus metabolitos foram analisados por UPLC 1290 acoplado ao detector de triplo quadrupolo 6460 da Agilent Technologies®. Os analitos foram

detectados utilizando electropulverização ionização negativa e monitoramento de vários reação dos íons de transição. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Zorbax Eclipse C18 2,1 x 50 mm 1,8 um. A taxa de fluxo de, em gradiente, com os eluentes acetonitrila (eluento A): 0,2% de ácido fórmico (eluento B) a uma temperatura de coluna de 40 ° C. Um gradiente crescente de eluento A foi usado, a partir de 5% de 0-2 min, 5-15% durante 2-7 min e 15-50% durante 7-15 min. O volume de injeção das amostras foi de 5 µl no UPLC.

Mass Spectrometry

A voltagem capilar foi de 2500V, o fluxo de gás nebulizador foi de 10 L / min a uma pressão de 35 psi e a uma temperatura de 300 ° C. Em relação aos parâmetros de MS / MS, as energias de colisão foram otimizadas usando o software de Massa Hunter Optimizer em interface ao dispositivo. No resveratrol, a energia de colisão foi de 14 V para a transição 227> 185 (quantificador) e 20 V para 227> 142,2 (qualifier). No dihidroresveratrol metabólito da energia de colisão foi de 10 V para a transição 229/123 (quantificador) e 22 V para 229> 81,0 (qualifier). Foi utilizada como um padrão interno trans- resveratrol [13-C6] como quantificador e qualificador. A quantificação do resveratrol e dihidroresveratrol foi gerado através do gráfico de TIC (Cromatografia total Ion) em que MRM (monitoramento de reações múltiplas) será o método usado para demonstrar as transições, designando a transição quantificador.

ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi usada a análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey para identificação de possíveis diferenças significativas entre os grupos, considerando significativo $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para correlação entre o resveratrol e dihidroresveratrol com as Bactérias, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. As análises serão realizadas através do software GraphPad Prism 5

Tabela 2 - Desenho do Estudo

GRUPOS	N	INDUÇÃO de DM1 (STZ 5mg)	TRATAMENTO COM RESVERATROL	INICIO DO TRATAMENTO	COLETA DAS FEZES METAGE.	COLETA DE FEZES LC
C	n=6	Não Submetido	Não Submetido	NS	Ultimo dia de tratamento	NS
D	n=6	8 dias	Não Submetido	NS	Ultimo dia de tratamento	NS
DR	n=12					
DR 5mg	n=4	8 dias	Diariamente por 9 Semanas	Após 8 dias	Ultimo dia de tratamento	Ultimo dia de tratamento
DR 10mg	n=4	8 dias	Diariamente por 9 Semanas	Após 8 dias	Ultimo dia de tratamento	Ultimo dia de tratamento
DR 20mg	n=4	8 dias	Diariamente por 9 Semanas	Após 8 dias	Ultimo dia de tratamento	Ultimo dia de tratamento
R	n=12					
R 5mg	n=4	Não Submetido	Diariamente por 9 Semanas	Após 8 dias	Ultimo dia de tratamento	Ultimo dia de tratamento
R 10mg	n=4	Não Submetido	Diariamente por 9 Semanas	Após 8 dias	Ultimo dia de tratamento	Ultimo dia de tratamento
R 20mg	n=4	Não Submetido	Diariamente por 9 Semanas	Após 8 dias	Ultimo dia de tratamento	Ultimo dia de tratamento

RESULTADOS

Caracterização da síntese do dihidroresveratrol

RMN

^1H NMR (MeOD, 500 MHz): 2.651 (m, H1), 2.756(m, H2), 6.076 (t, H4'), 6,117 (d, H-2' e H-6'), 6,657(d, 2H'' e 6H''), 6,651(d, H3'' e H5''). ^{13}C RMN (MeOD, 500 MHz): 38.1(C7), 39,6 (C8), 101,08(C3), 108.1(C1 e C5), 115.98(C11 e C13), 130.34(C10 e C14), 134.10(C9), 145.61(C6), 156.39(C12), 159.29(C2 e C4) (Figura 8)

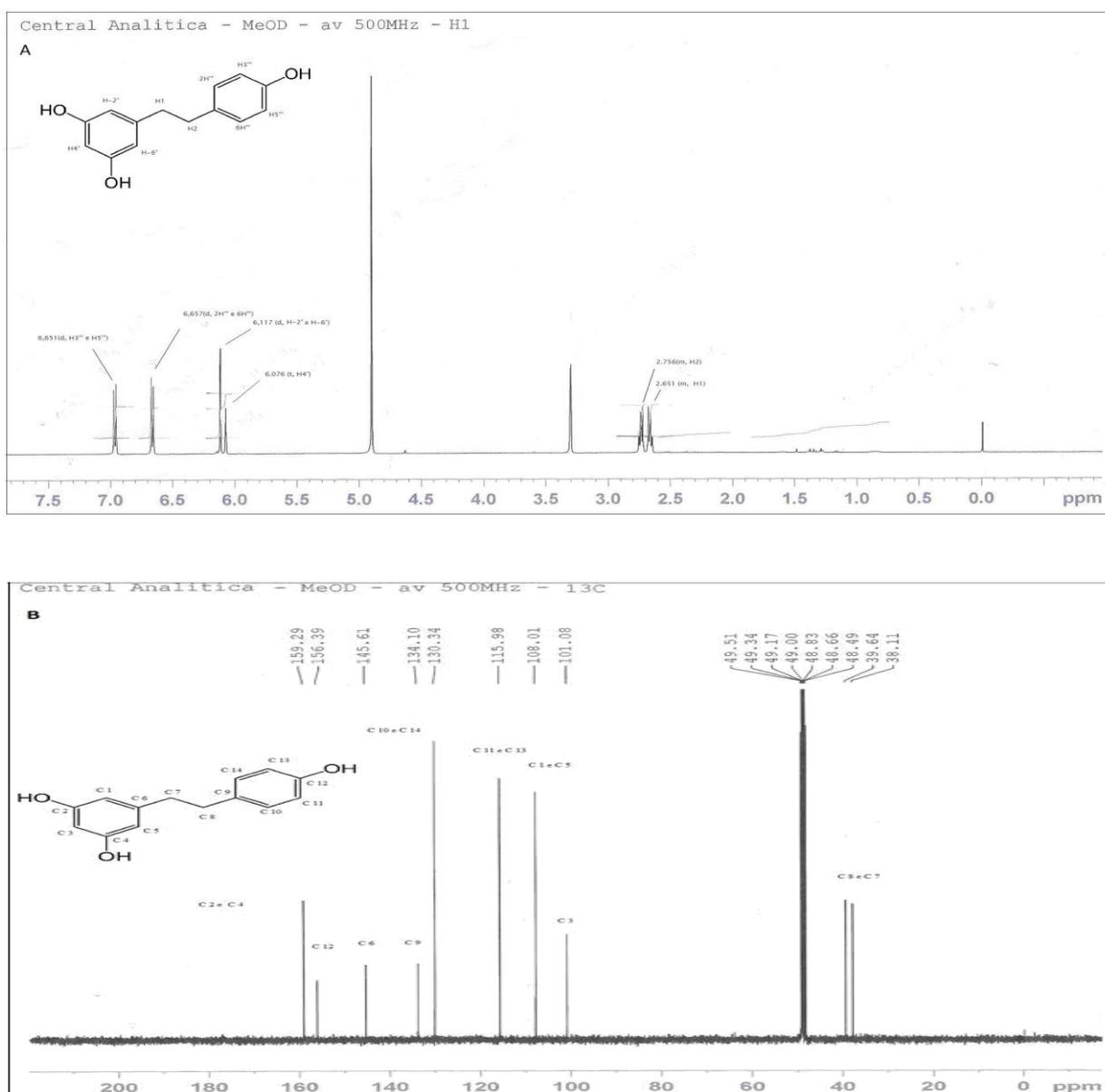


Figura 8 A figura (A) e (B), demonstram os espectros de RMN, destacando cada região da molécula. A figura (A) demonstra o RMN ^1H e a figura (B) o RMN ^{13}C .

Ultravioleta

O composto sintetizado apresentou diferente absorção de comprimento de onda maximo, esta absorção foi diferente da constatada no produto de partida. O scaneamento do produto dihidroresveratrol, demonstrou absorção do comprimento de onda maximo em 276 nm. Este difere do comprimento de onda maximo absorvido pelo resveratrol, ao qual demonstra 306 nm(FIGURA 9). Os comprimentos de onda dos compostos condizem com análises anteriores da literatura.

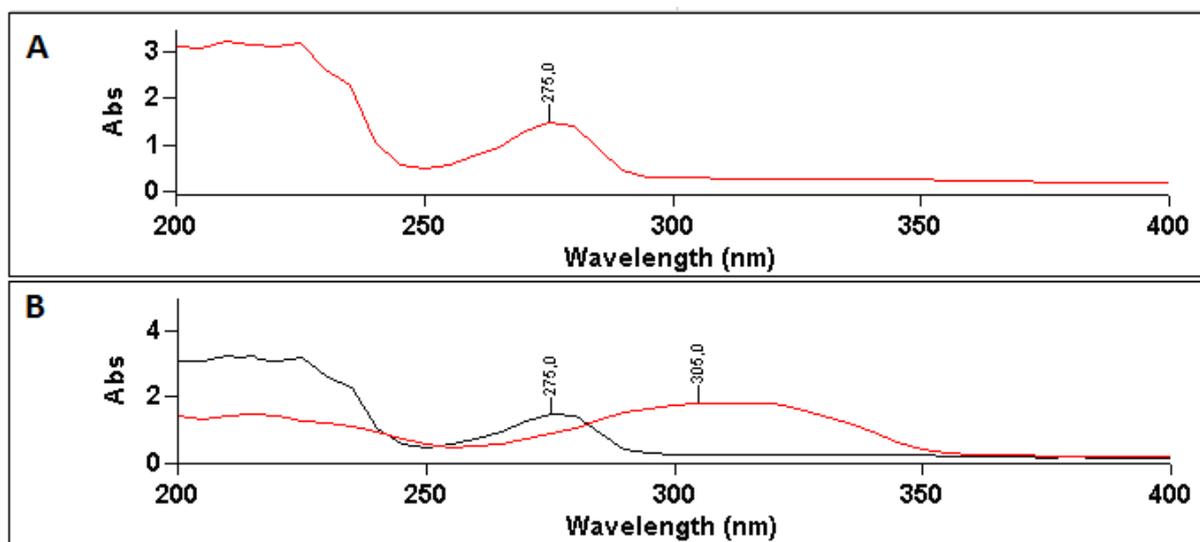


Figura 9 Espectro de ultravioleta, espectro do metabolite dihidroresveratrol(A) e solução com resveratrol e dihidroresveratrol.

Espectrometria de Massa

A análise de massa do produto sintetizado, apresentou ions moleculares do resveratrol e dihidroresveratrol de 227⁻ e 229⁻, respectivamente (FIGURA 10). A utilização da fragmentação através do CID, foi utilizado para o aumento da especificidade dos compostos. Os compostos demonstraram fragmentos de 185⁻ e 143⁻, para o resveratrol e 123⁻ e 81⁻ para o dihidroresveratrol, através da análise de MRM (FIGURA 11)

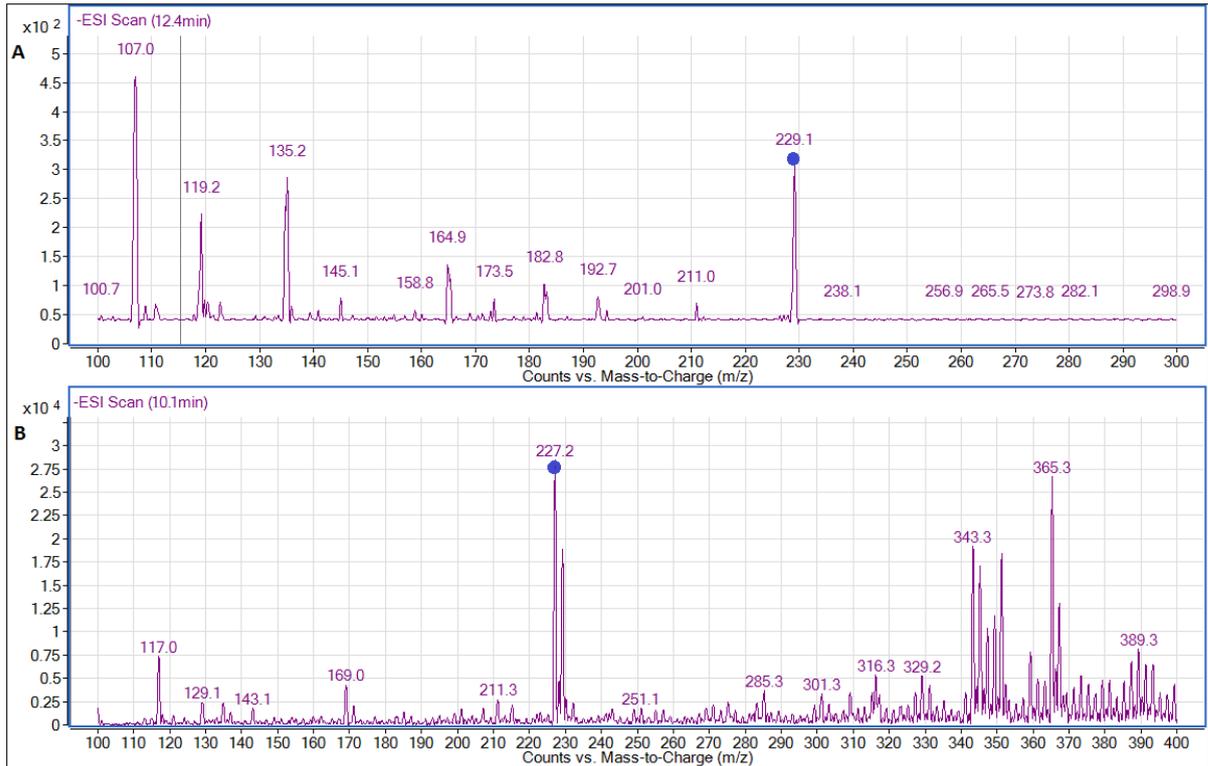


Figura 10 Full Scan- Em destaque o íon molecular do dihidroresveratrol(A) e resveratrol(B).

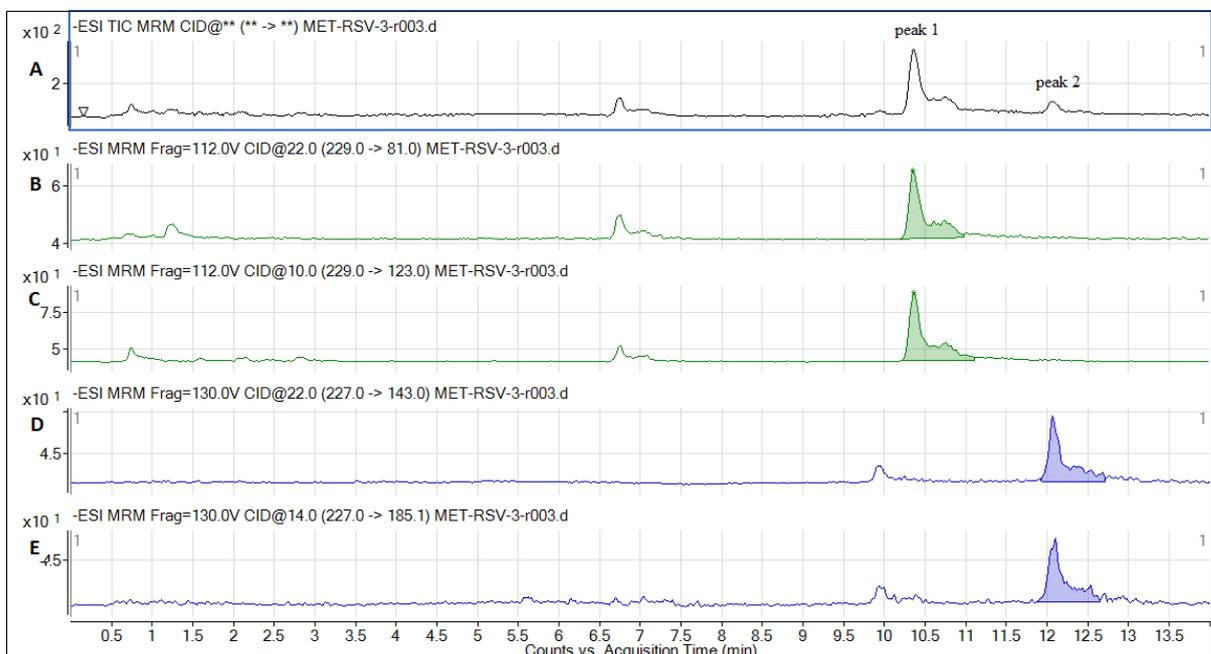


Figura 11 TIC(A)- Destacando os picos cromatograficos do dihidroresveratrol(pico1) e resveratrol(pico2). MRM- Destaque da quantificação através das áreas, designando os íons quantificadores e qualificadores do dihidroresveratrol(B,C) e resveratrol(D,E).

Modelo de indução a diabetes tipo 1

Os animais relativos aos grupos diabeticos, apresentaram indução após um período de 4 dias, onde o D1 foi relativo a injeção de STZ. Somente os animais com níveis sanguíneos de >300 mg.dL⁻¹ e sintomas de poliúria e polidipsia foram considerados diabeticos e selecionados para o estudo. Todos os animais induzidos apresentaram sintomas característicos da doença, sendo estes poliúria, polidipsia, além de níveis de glicemia superior a 300 mg.dL⁻¹.

Glicemia e peso corporal

No dia 1 (D1), não houve diferença significativa na glicemia e o peso corporal entre os grupos. A partir de D4 em diante, os animais dos grupos DM apresentou sintomas de diabetes típicas, incluindo os níveis de glicose no sangue superior a 300 mg / dL, poliúria e polidipsia(TABELA 3).

Groups/Day	D1		D4		D30		D60	
	Glycemia (mg.dl ⁻¹)	BW (g)	Glycemia (mg.dl ⁻¹)	BW (g)	Glycemia (mg.dl ⁻¹)	BW (g)	Glycemia (mg.dl ⁻¹)	BW (g)
NDM+S	89.1±4.1	392.0±23.0	88.6±4.5	380.3±59.9	88.0±10.8	434.7±29.6	83.0±9.8	478.7±20.0
DM+S	81.0±4.2	373.0±24.0	321.5±2.1 ^{ab}	337.0±24.0	510.5±91.2 ^{ab}	313.0±24.0	458.5±44.5 ^{ab}	304.0±19.8
NDM+RSV5	75.3±6.5	400.0±51.4	82.3±8.7	422.7±46.9	81.0±1.0	464.0±63.2 ^d	78.6±12.2	500.7±51.9 ^e
NDM+RSV10	91.0±8.0	375.0±15.5	86.6±7.5	406.7±29.9	89.3±17.0	454.0±39.8	88.0±9.8	492.7±43.7
NDM+RSV20	93.3±7.0	385.3±26.8	91.6±5.8	407.3±23.0	94.3±15.3	454.0±39.8 ^d	90.3±5.6	550.7±11.0 ^e
DM+RSV5	93.3±7.0	386.0±5.6	327.5±28.9 ^{ab}	321.0±4.2	555.5±62.9 ^{ab}	303.0±15.5	439.5±22.7 ^{ab}	273.0±49.5 ^b
DM+RSV10	90.5±9.1	389.3±13.0	309.0±1.4 ^{ab}	359.0±9.8	397.0±1.4 ^{ab}	339.0±12.7 ^d	476.5±86.9 ^{ab}	313.0±35.3 ^e
DM+RSV20	84.5±4.9	342.0±2.8	309.0±15.5 ^{ab}	292.0±33.9	492.0±1.2 ^{ab}	256.0±22.6 ^a	522.0±33.9 ^{ab}	241.0±38.1 ^b

Tabela 3 – Peso e glicemia durante os 60 dias de tratamento. NDM+RSV5 (não diabético + resveratrol 5 mg.kg-1), NDM+RSV10 (não diabético + resveratrol 10 mg.kg-1), NDM+RSV20 (não diabético + resveratrol 20 mg.kg-1), DM+RSV5 (diabético + resveratrol 5 mg.kg-1), DM+RSV10 (diabético + resveratrol 10 mg.kg-1), DM+RSV20 (diabético + resveratrol 20 mg.kg-1).

a Corresponde a $p < 0.001$ when compared to to the same group in D1

b Corresponde a $p < 0.001$ when compared to NDM groups

Curva de calibração do resveratrol e dihidroresveratrol

A curva de calibração consistiu de cinco diferentes concentrações, tanto para o resveratrol, quanto para o dihidroresveratrol. As duas curvas de calibração foram construídas através de diferentes concentrações, e suas respectivas áreas sobre a curva (AUC), obtidas através da espectrometria de massa. Para o resveratrol, a curva de calibração contou com concentrações de 0.1, 1.0, 10.0, 100.0, 200.0 mg.ml⁻¹, com equação da reta de $Y = 174,1 \cdot X - 280,1$ e $r=0,9991$.

Para o dihidroresveratrol, a curva de calibração contou com concentrações de 0.1, 0.5, 1.0, 10.0, 100.0 mg.ml⁻¹, com equação da reta de $Y = 761,1 \cdot X - 155,1$ e $r=0,9952$. (Figura 12)

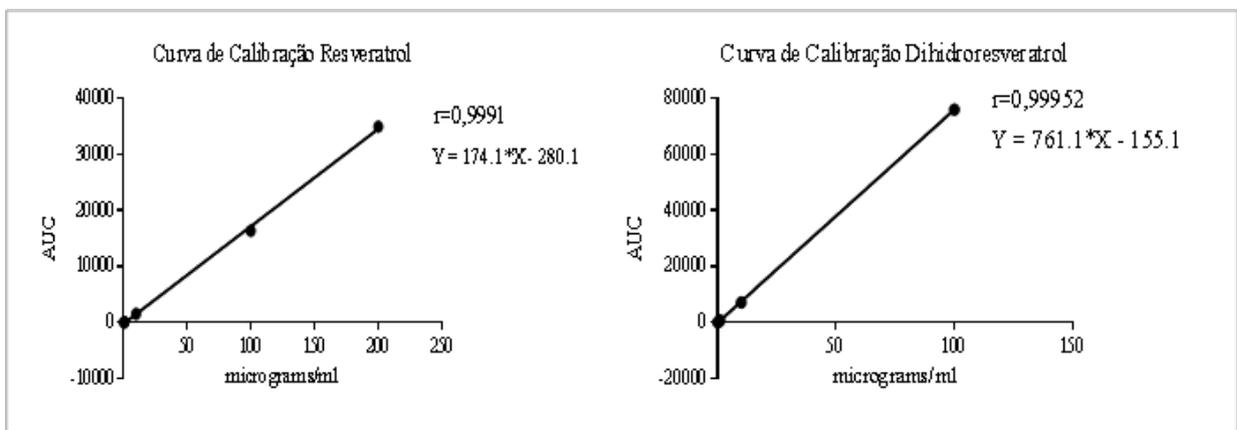


Figura 12 (A) Curva de calibração do resveratrol. (B) Curva de calibração dihidroresveratrol.

1.1 Quantification of resveratrol and dihydroresveratrol

Quantificação de resveratrol ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) eliminados nas fezes de animais não apresentou nenhuma diferença significativa entre os grupos (Figura 4). O aumento nas doses de resveratrol foi capaz de produzir níveis mais elevados de dihidroresveratrol em animais saudáveis e diabéticos. No entanto, os grupos DM tratadas com resveratrol com baixos níveis de dihidroresveratrol quando comparados com os animais saudáveis tratados com as mesmas doses de resveratrol (**FIGURA 13**).

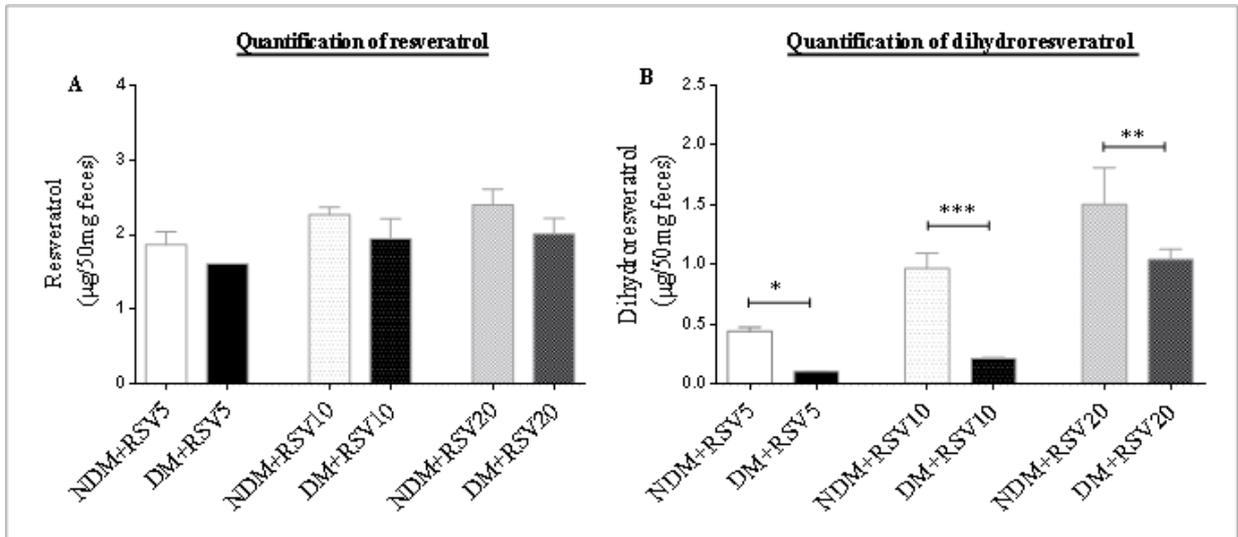


Figura 13 Quantificação de resveratrol (A) e dihydroresveratrol (B). NDM + S (não-diabética+salina); NDM+RSV5 (resveratrol+não-diabética 5 mg.kg⁻¹); NDM + RSV10 (não-diabética+resveratrol 10 mg.kg⁻¹); NDM + RSV20 (não-diabético + resveratrol 20mg.kg⁻¹); p <0,05 = *, P <0,01 ** = p <0,001 = ***.

Quantificação de *A.muciniphila*

A quantificação de *A.muciniphila* (célula log₁₀ / g de fezes) demonstrou que o tratamento com resveratrol foi capaz de aumentar a quantidade de bactéria nos grupos NDM + RSV5, NDM + RSV20 quando comparado ao grupo NDM + S (p <0.001). Em animais diabéticos, grupos DM + RSV5 e DM + RSV10 apresenta um aumento significativo na população *A. Muciniphila* em relação ao DM + grupo S (p <0.001) (FIGURA 14).

Quantificação de *Bacteroidetes*

A quantificação de *Bacteroidetes* (célula log₁₀ / g de fezes) demonstrou que o tratamento com resveratrol foi capaz de aumentar a quantidade de bactéria nos grupos NDM + RSV5, NDM + RSV20 quando comparado ao grupo NDM + S (p <0.001). Em animais diabéticos, grupos DM + RSV10 e DM + RSV20 apresenta um aumento significativo na população *Bacteroidetes* em relação ao DM + grupo S (p <0.001) (FIGURA 15).

Quantificação de *Prevotella*

A quantificação de *Prevotella* (célula log₁₀ / g de fezes) demonstrou que o tratamento com resveratrol foi capaz de aumentar a quantidade de bactéria no grupo NDM + RSV20 quando comparado ao grupo NDM + S ($p < 0,001$). Em animais diabéticos, grupos DM + RSV10 e DM + RSV20 apresenta um aumento significativo na população *Prevotella* em relação ao DM + grupo S ($p < 0,001$) (FIGURA 16).

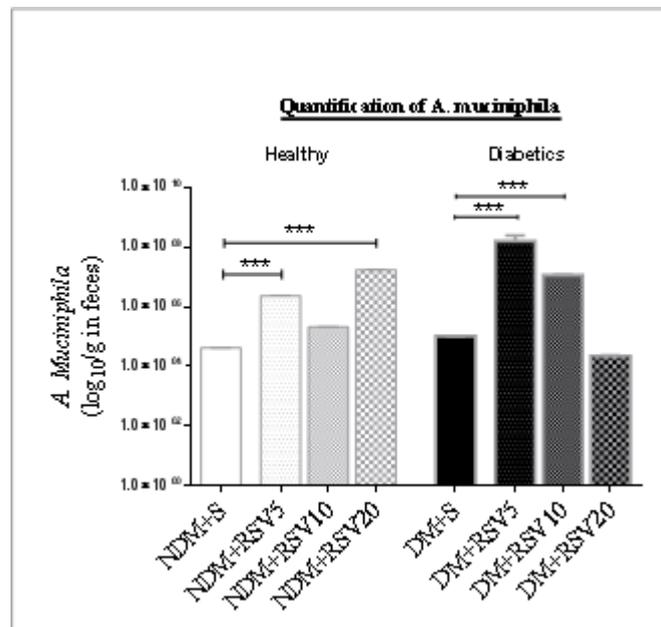


Figura 14 Quantificação de *A. muciniphila* em animais saudáveis e diabéticos: NDM + S (não-diabético + salina); NDM + RSV5 (não-diabético + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); NDM + RSV10 (não-diabético + resveratrol 10 mg.kg⁻¹); NDM + RSV20 (não-diabético + resveratrol 20mg.kg⁻¹); DM + S (diabético + salina); DM + RSV5 (Diabético + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); DM + RSV10 (Diabético + resveratrol 10 mg.kg⁻¹); DM + RSV20 (diabético + resveratrol 20mg.kg⁻¹); $p < 0,05 = *$, $P < 0,01 ** = p < 0,001 = ***$.

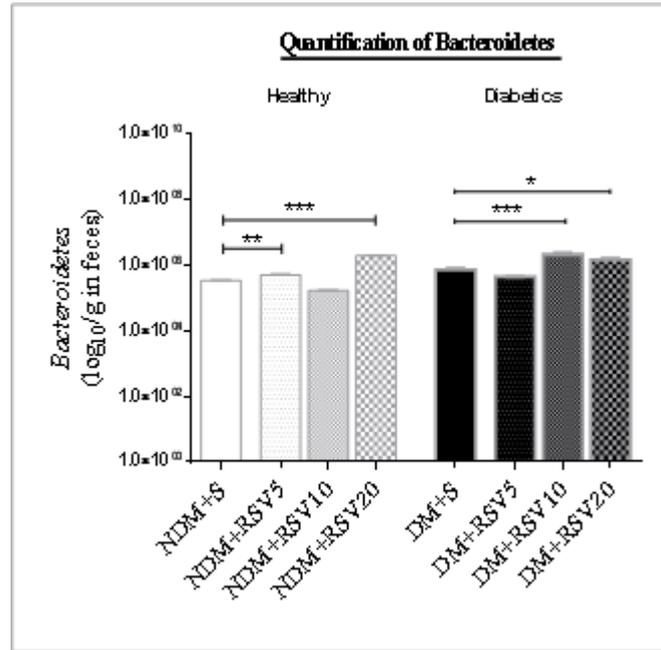


Figura 15 Quantificação de *Bacteroidetes* em animais saudáveis e diabéticos: NDM + S (não-diabético + salina); NDM + RSV5 (não-diabético + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); NDM + RSV10 (não-diabético + resveratrol 10 mg.kg⁻¹); NDM + RSV20 (não-diabético + resveratrol 20mg.kg⁻¹); DM + S (diabético + salina); DM + RSV5 (Diabético + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); DM + RSV10 (Diabético + resveratrol 10 mg.kg⁻¹); DM + RSV20 (diabético + resveratrol 20mg.kg⁻¹); p < 0,05 = *. P < 0,01 ** = p < 0,001 = ***.

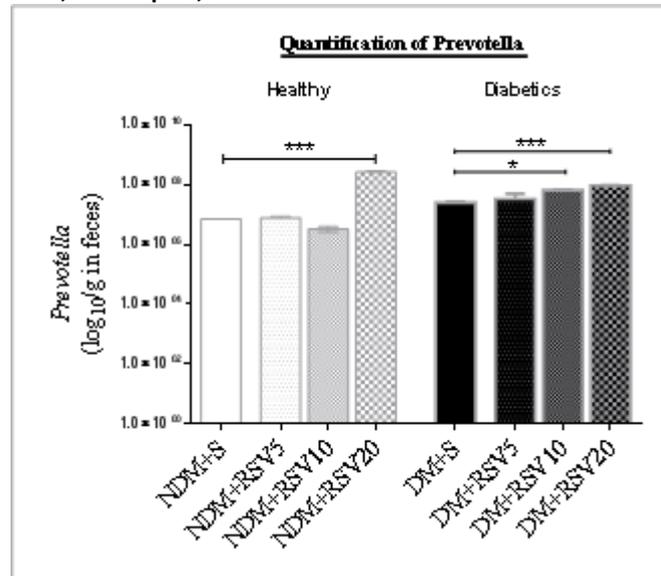


Figura 16 Quantificação de *Prevotella muciniphila* em animais saudáveis e diabéticos: NDM + S (não-diabético + salina); NDM + RSV5 (não-diabético + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); NDM + RSV10 (não-diabético + resveratrol 10 mg.kg⁻¹); NDM + RSV20 (não-diabético + resveratrol 20mg.kg⁻¹); DM + S (diabético + salina); DM + RSV5 (Diabético + resveratrol 5 mg.kg⁻¹); DM + RSV10 (Diabético + resveratrol 10 mg.kg⁻¹); DM + RSV20 (diabético + resveratrol 20mg.kg⁻¹); p < 0,05 = *. P < 0,01 ** = p < 0,001 = ***.

Correlação entre *A. Muciniphila*, resveratrol e dihydroresveratrol

O teste Person mostrou correlação entre os níveis de *A. Muciniphila* e dihydroresveratrol. Em animais saudáveis esta correlação foi positiva ($r = 0.67$), em animais diabéticos foi negativa ($r = -0.74$). (FIGURA 17).

Correlação entre *Bacteroidetes*, resveratrol e dihydroresveratrol

O teste Person mostrou correlação entre os níveis de *Bacteroidetes* e dihydroresveratrol. Em animais saudáveis esta correlação foi positiva ($r = 0.73$), em animais diabéticos não houve correlação ($r = 0.24$). (FIGURA 18).

Correlação entre *Prevotella*, resveratrol e dihydroresveratrol

O teste Person mostrou correlação entre os níveis de *Prevotella* e dihydroresveratrol. Em animais saudáveis esta correlação foi positiva ($r = 0.80$), em animais diabéticos foi positiva ($r = 0.73$). (Figura 19).

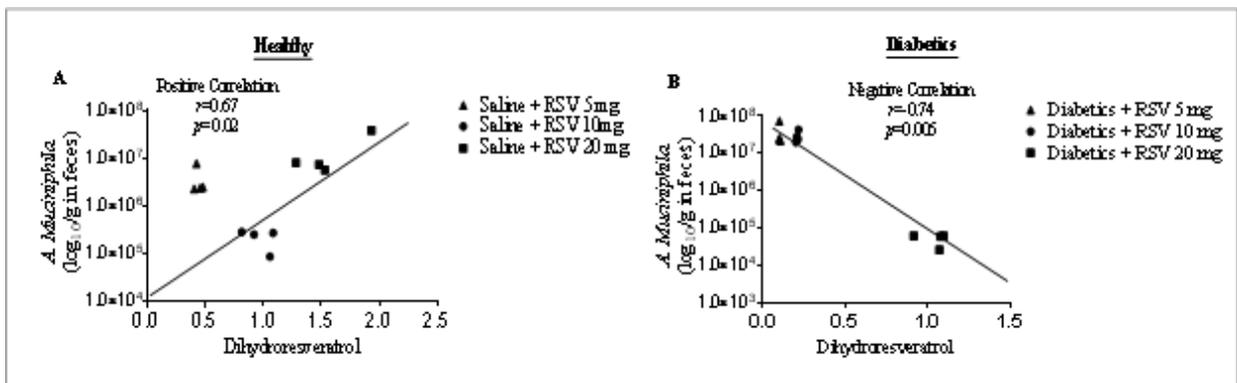


Figura 17 Análise Pearson - Correlação entre *A. muciniphila* e dihydroresveratrol em saudável (A) e diabéticos (B) animais.

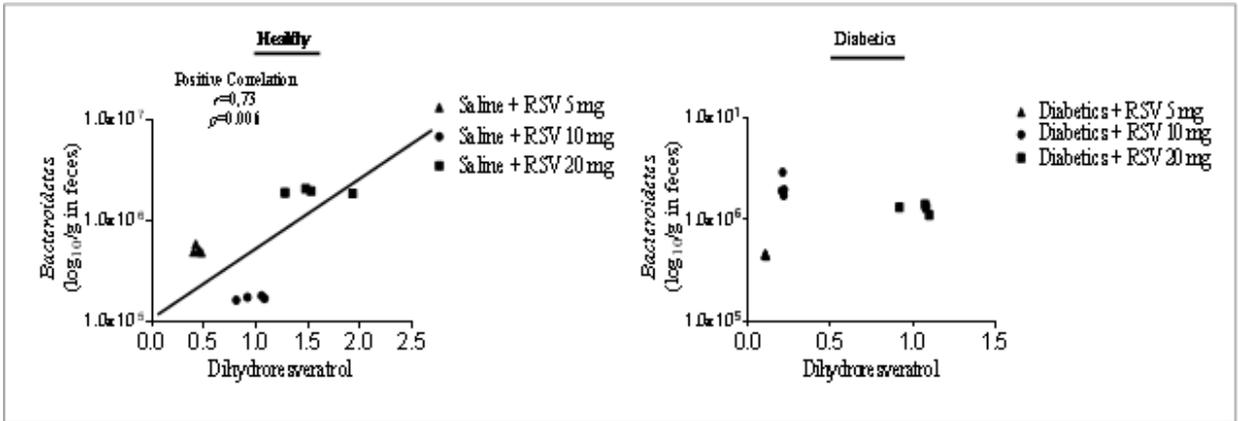


Figura 18 Análise Pearson - Correlação entre *Bacteroidetes* e dihydroresveratrol em saudável (A) e diabéticos (B) animais.

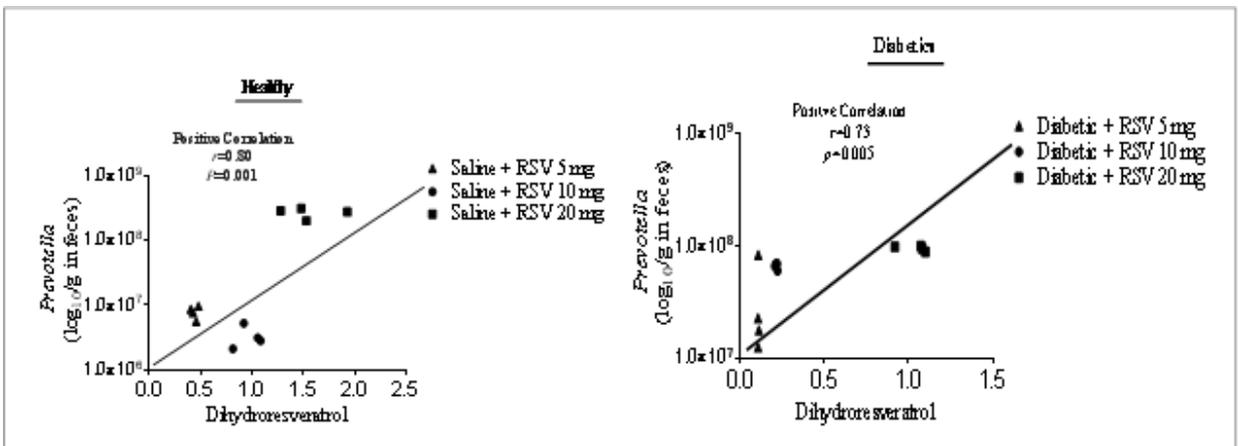


Figura 19 Análise Pearson - Correlação entre *Prevotella* e dihydroresveratrol em saudável (A) e diabéticos (B) animais.

DISCUSSÃO

O modelo de diabetes tipo 1 utilizado em nosso estudo foi baseada na literatura, onde a mesma, demonstra que, após a instalação da doença há redução da população de Bactérias intestinais comensalistas, seguido do aumento de disbiose intestinal. Estudos demonstram que anteriormente e, após adquirir a doença, há uma diferença significativa entre as biotas. Observa-se a diminuição de Bactérias importantes para a saúde intestinal, e o aumento de Bactérias transitórias, patogênicas ou não. (TAI N. *et al.*, 2015; JING Y-H. *et al.* 2010; WIRTH R. *et al.*, 2014)

Em nosso estudo, o tratamento com resveratrol não foi capaz de restaurar os níveis glicêmicos em animais diabéticos. O peso corporal dos animais diabéticos também não foram alterado após o tratamento com resveratrol, estes resultados estão de acordo com estudos anteriores. (BAGATINI, P. *et al.* 2014.; ATES, O. *et al.* 2007.; KUMAR, A. *et al.* 2007.)

Em relação à modulação microbiana, observa-se que o resveratrol induz um aumento não-linear da população *A. muciniphila* em animais normais e diabéticos. Não há nenhum estudo prévio na literatura sobre os efeitos do resveratrol sobre a população *A. Muciniphila*. Analisando os efeitos do resveratrol em outras Bactérias pro-bióticos é possível observar que as diferentes doses de resveratrol é capaz de produzir respostas diferentes nesta população microbiana (LARROSA, M. *et al.* 2009; QIAO, Y *et al.* 2014; ETEBERRIA, U. *et al.* 2015), apoiando dois conceitos: 1º-resveratrol e outros compostos podem atuar em populações bacterianas específicas, 2º-resveratrol e outros compostos podem apresentar uma resposta não linear em populações bacterianas. Em nosso estudo, observamos um aumento na população *A. muciniphila* em resposta não-linear, muito mais estudos são necessários para entender a dinâmica das colônias de Bactérias intestinais, e entender como *A. muciniphila* é afetado pelas mudanças na microbiota, produzido pelo resveratrol e outros compostos.

Os aumentos na população *A. muciniphila*, promovido pelo resveratrol reforça a importância deste composto, uma vez que esta bactéria apresenta uma ação preventiva em disorders metabólica. Um estudo prévio demonstra que, a administração de prebióticos promove uma melhoria da saúde intestinal correlacionada com um aumento na população de *A. muciniphila*. (EVERARD, A. *et al.* 2013)

Estudos apontam para importantes funções realizadas pela bactéria, tais como a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), que está ligada as vias de estimulação de insulina por aumento na produção de *peptide like glucagon* (GLP-1). Além disso, esses SCFA também teriam influencia no recrutamento de células do sistema imunológico. (LUKOVAC, S. *et al.* 2014) Em resumo, os nossos resultados indicam que o resveratrol é capaz de aumentar esta bactéria importante para a saúde intestinal.

O filo das *bacteroidetes* também apresentou aumento de maneira não linear, após a administração de diferentes doses de resveratrol. Este aumento foi observado tanto em animais diabéticos quanto em animais saudáveis. Estudos prévios demonstram o aumento do filo após administração de resveratrol. Estes trabalhos apontam para a importância do filo para a saúde, relacionando esta população bacteriana com diversos benefícios, como melhora geral de homeostasia metabólica e diminuição de processos inflamatórios intestinais. (QIAO, Y *et al.* 2014; ETEBERRIA, U. *et al.* 2015) Estes achados, vão ao encontro de nossos resultados visto que demonstramos o aumento da população de bacteroidetes. O aumento do filo demonstra que o resveratrol poderia ser utilizado, e tem potencial para a melhora da microbiota intestinal.

Os resultados relacionando o gênero *prevotella*, apresentaram algumas doses que poderiam ser utilizadas, visto que não foi observado aumento significativo nestas. O aumento nos níveis de *prevotella*, tanto em diabéticos, quanto em animais normais, não são consideradas ideais, visto que estudos anteriores demonstram que a bactéria pode estar relacionada com algumas doenças. Um estudo publicado por LUCKE, J. *et al* 2006, demonstra a prevalência do gênero *prevotella* em casos de colite ulcerativa. O autor destaca que a bactéria poderia estar associada com a patogênese da doença. O trabalho de SHER, J. *et al* 2013, demonstra a ação de uma espécie específica do gênero *prevotella*, *p. copri*, que associa-se com a patogênese da artrite. O autor destaca que, a presença da bactéria pode auxiliar na patogênese da doença, quando combinada com a predisposição genética do indivíduo.

As concentrações utilizadas no tratamento de ratos normais, 5 mg.kg⁻¹ e 10mg.kg⁻¹, não apresentaram alterações significativas. Estas doses poderiam ser utilizadas para o efeito prébiotico do resveratrol, ou seja, para o aumento dos níveis de outras Bactérias próbióticas. Já em animais diabéticos, apenas a dose de 5mg/kg poderia se considerada.

A não linearidade demonstrada em nossos resultados em relação às Bactérias poderia ser o fator pelo qual, alguns estudos que utilizam resveratrol alcançam resultados divergentes em diferentes doses.

Esta divergência de resultados fica explícita nos seguintes resultados: o estudo realizado por TIMMER, S. *et al* demonstrou os efeitos de uma suplementação com 150 mg de resveratrol diárias, onde o mesmo traz benefícios parecidos aos de uma dieta com restrição calórica em indivíduos obesos. Em contrapartida POULSEN, M. *et al* 2013. demonstram que, o tratamento com 500mg de resveratrol por 4 semanas, não é capaz de produzir efeitos detectáveis em pessoas obesas.

Estes dois resultados exemplificam os diferentes resultados obtidos através de diferentes doses de resveratrol. Mostrando que nem sempre o aumento de dose resulta em maiores ou melhores efeitos.

Outra hipótese interessante é que o resveratrol poderia mudar o equilíbrio da microbiota, promovendo um aumento em algumas populações bacterianas. Essa hipótese é apoiada por um estudo *in vitro* que analisa os efeitos do resveratrol em cepas bacterianas intestinais de ratos e seres humanos, mostrando que esta polifenol aumentar a taxa de crescimento de algumas Bactérias e inibir esta taxa em outros(JUNG, C. *et al.* 2009).

A alteração na microbiota produzida pelo resveratrol pode estar relacionada com a diminuição da mobilidade de algumas Bactérias, após a administração de resveratrol. Esta redução da motilidade bacteriana resultaria inabilidade da bactéria em buscar nutrientes, ocasionando a morte da bactéria. (WANG, W. *et al.* 2006)

O estudo realizado por CAI, H. *et al* 2015 apresenta de maneira mais clara o quadro de não linearidade dose-resposta do resveratrol. Este trabalho demonstra que a administração de doses diárias de 5mg pode ter maiores efeitos na supressão tumoral que a ingestão de 1g diária, em animais com cancer de colon retal.

Para nosso conhecimento, não há estudos sobre a concentração de dihidroresveratrol, nas fezes, em qualquer modelo de doença. Os estudos sobre o metabolito de resveratrol são, em geral, a cerca de farmacocinética (ROTCHES-RIBALTA, M. *et al.* 2012) e metabolism(WANG. D. *et al.* 2011). Entretanto, há indícios de uma relação entre o metabolito e a microbiota, uma vez que um estudo anterior, realizado em indivíduos saudáveis, mostra uma relação entre, a concentração do metabolito do resveratrol e alterações na microbiota. (BODE, L. *et al.* 2013)

Nosso estudo é o primeiro a analisar a concentração deste metabolito, nas fezes, de animais saudáveis e diabéticos. Observamos que animais saudáveis apresentam mais dihidroresveratrol nas fezes do que ratos diabéticos. Como esperado, o aumento da dose de

resveratrol promove um aumento na concentração dihidroresveratrol, este aumento é mais pronunciado em animais saudáveis.

Uma hipótese para explicar esta pequena concentração de dihidroresveratrol em animais diabéticos, em relação aos ratos saudáveis, é que a diabetes promove uma disbiose, reduzindo algumas Bactérias da flora microbiana normal e aumentando a concentração de Bactérias transitórias. Tendo em vista que o grupo de Bactérias responsáveis pelo metabolismo do resveratrol em dihidroresveratrol ainda não são conhecidos, é possível que o aumento da população de Bactérias transitórias poderia reduzir o metabolismo resveratrol.

Nós observamos que o aumento da concentração de metabólitos de resveratrol é positivamente correlacionado com a população *A. muciniphila*, *Bacteroidetes* e *Prevotella* em animais saudáveis. Nos animais diabéticos, estes mesmos parâmetros são negativamente correlacionados com *A. muciniphila*, não correlacionado com *Bacteroidetes* e positivamente correlacionado com o gênero *Prevotella*. Provavelmente, estes achados também estão relacionados com a diferente microbiota presente em animais saudáveis e diabéticos.

CONCLUSÃO

Em suma, relatamos em nosso estudo que, o tratamento com resveratrol promover alterações na microbiota. Demostramos o aumento de populações bacterianas muito importantes para a saúde intestinal, como: *A. muciniphila*, *Bacteroidetes*, em ratos *Wistar* saudáveis e diabéticos, em resposta não linear.

REFERÊNCIAS

- ABRIU N.; KAWASAKI E.; EGUICH K. Current knowledge of Japanese type 1 diabetic syndrome. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 18, p.357–366, 2002;
- ABT, M. C.; PAMER, E. G. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. **Current Opinion in Immunology**, v. 29, p. 16-22, Aug 2014. ISSN 0952-7915; 1879-0372.
- ANHÊ F. F. et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. **GUT MICROBIOTA.** v. 0, p. 1–12; 2014.
- ATES, O., CAYLI, S.R., YUCEL, N., ALTINOZ, E., KOCAK, A., DURAK, M.A., TURKOZ, Y., YOLOGLU, S., 2007. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Clin. Neurosci.: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia** 14 (3), 256–260
- BAGATINI PB, XAVIER LL, NEUES LT, SAUR L, BARBOSA S, BAPTISTA PPA, ET AL. Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats. **Brain Research.** 2014;**1592**:101-12.
- BODE, L. M. et al. In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 2, p. 295-309, Feb 2013. ISSN 0002-9165.
- BROWNLEE, L. A. et al. Action of reactive oxygen species on colonic mucus secretions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 800-808, Sep 1 2007. ISSN 0891-5849.
- CAI H, SCOTT E, KHOLGHI A, ANDREADI C, RUFINI A, KARMOKAR A, ET AL. Cancer chemoprevention: Evidence of a nonlinear dose response for the protective effects of resveratrol in humans and mice. **Science Translational Medicine.** 2015;**7**:(298).

CARDILE, V. et al. Chemo-enzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues. **Bioorganic Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 22-33, Feb 2005. ISSN 0045-2068.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C. et al. A role for lymphocytes and cytokines on the eosinophil migration induced by LPS. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 197-200, Dec 30 1997. ISSN 0074-0276.

CLEVERS, H. C. & BEVINS, C. L. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. **Annu. Rev. Physiol.** 75, 289–311 (2013).

DE ANGELIS, M. et al. Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. **Plos One**, v. 8, n. 10, Oct 9 2013. ISSN 1932-6203.

DERRIEN, M. et al. The mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1646-1648, Mar 2008. ISSN 0099-2240.

DUMAS, M. E. et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12511-12516, Aug 2006. ISSN 0027-8424.

ENDESFELDER, D. et al. Compromised Gut Microbiota Networks in Children With Anti-Islet Cell Autoimmunity. **Diabetes**, v. 63, n. 6, p. 2006-2014, Jun 2014. ISSN 0012-1797; 1939-327X.

ETEBERRIA U, ARIAS N, BOQUE N, MACARULLA MT, PORTILLO MP, MARTINEZ JA, ET AL. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 2015;**26**(6):651-60.

EVERARD A.; DELZENNE N.; CANI P. *Akkermansia muciniphila*: Une nouvelle bactérie jouant un rôle clé dans la fonction barrière de l'intestin, l'inflammation et les désordres métaboliques associés à l'obésité ? **Diabetes & Metabolism**, v.2, p. A24, Março 2012.

EVERARD, A. et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 9066-9071, May 28 2013. ISSN 0027-8424.

EVERARD, A. et al. Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2775-2786, Nov 2011. ISSN 0012-1797

FERREIRA S.R. Population-based incidence of IDDM in the state of Sao Paulo, Brazil. **Diabetes Care**. v.16, p.701–704,1993;.

FRANCIOSO, A. et al. Chemistry, Stability and Bioavailability of Resveratrol. **Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 237-245, May 2014. ISSN 1573-4064.

GOMES, A. C. et al. Gut microbiota, probiotics and diabetes. **Nutrition Journal**, v. 13, p. 13, Jun 2014. ISSN 1475-2891.

GOMES, N. E. et al. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 9, p. 853-859, Sep 2010. ISSN 0100-879X.

GREEN A.; PATTERSON C.C. Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. **Diabetologia**. v.44, p.B3–8, 2001;.

HWA KIM; SEOK-JEONG OH; YINGQIU LIU; MOO-YEOL LEE. A Comparative Study of the Anti-Platelet Effects of cis- and trans-Resveratrol. **Biomolecules & Therapeutics**, Biomol Ther 19(2), 201-205 (2011).

INRNACULADA N. et al. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. **JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY**. v. 56, p. 1669-1674, DEC 2007.

JING Y-H, CHEN K-H, YANG S-H, KUO P-C, CHEN J-K. Resveratrol ameliorates vasculopathy in STZ-induced diabetic rats: role of AGE-RAGE signalling. **Diabetes-Metabolism Research and Reviews**. 2010;**26**(3):212-22

JOHANSSON, M. E. et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. **Cell. Mol. Life Sci.** 68, 3635–3641 (2011).

JUAN ME, VINARDELL MP, PLANAS JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. **J Nutr.** v.132, p.257-260, 2002.

JUNG CM, HEINZE TM, SCHNACKENBERG LK, MULLIS LB, ELKINS SA, ELKINS CA, ET al. Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. *Fems Microbiology Letters*. 2009;**297**(2):266-73.

KIM Y.S.; MILNER J.A. Dietary modulation of colon cancer risk. **J. Nutr.** v.137 , p.2576-2579, 2007.

KNIGHT, D. J. W.; GIRLING, K. J. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, n. 9371, p. 1831-1831, May 24 2003. ISSN 0140-6736.

KUMAR, A., KAUNDAL, R.K., IYER, S., SHARMA, S.S., 2007. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. **Life Sci.** 80 (13), 1236–1244

LARROSA M, JOSEFA YANEZ-GASCON M, VICTORIA SELMA M, GONZALEZ-SARRIAS A, TOTI S, JOAQUIN CERON J, ET AL. Effect of a Low Dose of Dietary Resveratrol on Colon Microbiota, Inflammation and Tissue Damage in a DSS-Induced Colitis Rat Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2009;**57**(6):2211-20.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S. & GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature** v.**444**, p. 1022–1023, 2006.

LUCKE, K; MIEHLKE, S; JACOBS, E; Prevalence of Bacteroides and Prevotella spp. in ulcerative colitis. **JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY**. V. 55, P. 617-624, 2006.

LUKOVAC S, BELZER C, PELLIS L, KEIJSER BJ, DE VOS WM, MONTIJN RC, ET AL. Differential Modulation by Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids. **Mbio**. 2014;**5**:(4)

MANICHANH C et al.: Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* v.55(2),p.205–211, 2006.

MARTELO-VIDAL, M. J.; VAZQUEZ, M. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. **Food Chemistry**, v. 158, p. 28-34, Sep 1 2014. ISSN 0308-8146; 1873-7072.

MASLOWSKI, K. M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature** v.461, p.1282–1286 2009.

MAZMANIAN S.K Capsular polysaccharides of symbiotic bacteria modulate immune responses during experimental colitis. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** 46 Suppl.1 , E11-E12, 2008.

MICHAN, S. ; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **BIOCHEMICAL JOURNAL**. V. 404, p1-13;2007

MÓNICA ANDREWS, NÉSTOR SOTO, MIGUEL ARREDONDO. Effect of metformin on the expression of tumor necrosis factor- α , Toll like receptors 2/4 and C reactive protein in obese type-2 diabetic patients. **Rev Med Chile**, 2012; 140: 1377-1382.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v 14, 667–685, September 2014.

NASERIBAFROUEI, A. et al. Correlation between the human fecal microbiota and depression. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 26, n. 8, p. 1155-1162, Aug 2014. ISSN 1350-1925; 1365-2982.

ONKAMO P.; VAANANEN S.; KARVONEN M.; TUOMILEHTO J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes—the analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia**. v. 42, p. 1395–1403,1999;.

PANTUSA, M.; BARTUCCI, R.; RIZZUTI, B. Stability of trans-Resveratrol Associated with Transport Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4384-4391, May 14 2014. ISSN 0021-8561; 1520-5118.

PARK EJ, PEZZUTO JM, The pharmacology of resveratrol in animals and humans. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**. 2015;**1852**:1071-1113.

PELASEYED, T. et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. **Immunological Reviews**, v. 260, n. 1, p. 8-20, Jul 2014.

PICARD, C. et al. Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, n. 6, p. 495-512, Sep 15 2005. ISSN 0269-2813.

PIROT P.; CARDOZO A.K.; EIZIRIK D.L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v.52, p.156-165, 2008;.

POULSEN, M. *et al.*;High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. **Diabetes**. v.62, p.1186-95, 2013.

QIAO Y, SUN J, XIA S, TANG X, SHI Y, LE G. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. **Food & Function**. 2014;**5**(6):1241-9.

QIAO, Y. et al. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1241-1249, Jun 2014. ISSN 2042-6496; 2042-650X.

QUEIPO-ORTUNO MI, BOTO-ORDONEZ M, MURRI M, GOMEZ-ZUMAQUERO JM, CLEMENTE-POSTIGO M, ESTRUCH R, ET AL. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. **American Journal of Clinical Nutrition**. 2012;**95**(6):1323-34.

ROTCHES-RIBALTA M, ANDRES-LACUEVA C, ESTRUCH R, ESCRIBANO E, URPI-SARDA M. Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. **Pharmacological Research**. 2012;**66**(5):375-82.

SALYERS A.A; VERCELOTTI J.R.; WEST S.E. Fermentation of Mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. **Appl. Environ. Microbiol.** v.33 , p.319-322, 1977.

SCHER, J. U. et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **Elife**, v. 2, p. 20, Nov 2013. ISSN 2050-084X.

SCHNEDL W.J.; FERBER S.; JOHNSON J.H.; NEWGARD C.B. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**. v.43, p. 1326–1333. 1994;

SHAFRIR E. Diabetes in animals: contribution to the understanding of diabetes by study of its etiopathology in animal models. **Em: Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus. Porte D Jr, Sherwin RS, Baron A (editores). Appleton & Lange**. 1997.

SHIN N. et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. **Gut microbiota**. V. 63, p.727–735. July 28, 2014.

SIEMANN E.H.; CREASY L.L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **Am J Enol Vitic**;v.43, p.49-52. 1992.

SIMA A.A. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. **Acta Diabetol.** v. 47, p.279-293, 2010;.

SINA, C. et al. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. **J. Immunol.** v.183, p.7514–7522 2009.

SOUTO AA, CARNEIRO MC, SEFERIN M, SENNA MJH, CONZ A, GOBBI K. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis.** 2001;**14**(4):441-5

SOYUCEN, E. et al. Differences in the gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes. **Pediatrics International**, v. 56, n. 3, p. 336-343, Jun 2014. ISSN 1328-8067; 1442-200X.

STILLING, R. M.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. **Genes Brain and Behavior**, v. 13, n. 1, p. 69-86, Jan 2014. ISSN 1601-1848; 1601-183X.

SUN, X.; PENG, B.; YAN, W. Measurement and correlation of solubility of trans-resveratrol in 11 solvents at T = (278.2, 288.2, 298.2, 308.2, and 318.2) K. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 40, n. 4, p. 735-738, Apr 2008. ISSN 0021-9614.

TAI N, WONG FS, WEN L. The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.** 2015;**16**(1):55-65.

TATTOLI, I. et al. Microbiota, Innate Immune System, and Gastrointestinal Muscle Ongoing Studies. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, n. 9, p. S6-S11, Oct 2012. ISSN 0192-0790.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. **Gut**, v. 63, n. 9, p. 1513-1521, Sep 2014. ISSN 0017-5749; 1468-3288.

TIMMERS, S. *et al.* Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. **Cell Metab.**V.14, p.612-22, 2011.

TOLHURST, G. *et al.* Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. **Diabetes** v.61, p.364–371 2012.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, May 1996. ISSN 0021-8561.

VALENTINA TREMAROLI AND FREDRIK BÄCKHED. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v.489, p.242–249, 13 September 2012.

VIEIRA, S. M.; PAGOVICH, O. E.; KRIEGEL, M. A. Diet, microbiota and autoimmune diseases. **Lupus**, v. 23, n. 6, p. 518-526, May 2014. ISSN 0961-2033; 1477-0962.

VISIOLI F. The resveratrol fiasco. **Pharmacological Research**. 2014;**90**:87-.

WALLE, T. *et al.* High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, Dec 2004. ISSN 0090-9556.

WANG D, ZHANG Z, JU J, WANG X, QIU W. Investigation of piceid metabolites in rat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. 2011;**879**(1):69-74.

WANG W-B, LAI H-C, HSUEH P-R, CHIOU RYY, LIN S-B, LIAW S-J. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. **Journal of Medical Microbiology**. 2006;**55**(10):1313-21.

WEN, L. *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1109-U10, Oct 23 2008. ISSN 0028-0836.

WHITMAN W.B; COLEMAN D.C.; WIEBE W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci.EUA**. v. 95 , p. 6578-6583, 1998.

WIRTH R, BODI N, MAROTI G, BAGYANSZKI M, TALAPKA P, FEKETE E, ET AL. Regionally Distinct Alterations in the Composition of the Gut Microbiota in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. **Plos One**. 2014;**9**(12).

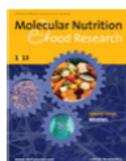
ZAMORA-ROS, R. et al. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. **Br J Nutr**, v. 100, n. 1, p. 188-96, Jul 2008. ISSN 1475-2662.

ZAURA E. et al. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. **BMC Microbiol**. v.9 p.259, 2009;

ZHANG H. et al.: Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. v.106(7),p.2365–2370, (2009);

ANEXO 1

Molecular Nutrition and Food Research



Resveratrol induces increased levels of Akkermansia muciniphila in healthy and diabetic Wistar rats in a non-linear response

Journal:	<i>Molecular Nutrition and Food Research</i>
Manuscript ID	mnfr.201600883
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	07-Oct-2016
Complete List of Authors:	Adami, Bruno; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Departamento de Química Pura Baqatini, Pamela; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfológicas Leite, Carlos; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Instituto de Toxicologia e Farmacologia Cantarelli, Vladimir; Universidade FEEVALE, Departamento de Biologia Molecular Volkart, Priscylla; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Departamento de Química Pura Achaval, Matilde; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfológicas Xavier, Léder; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas Schirmer, Helena; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Departamento de Ciências Básicas da Saúde Souto, Andre; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Departamento de Química Pura
Keywords:	resveratrol, microbiota, Akkermansia muciniphila, type 1 diabetes, UPLC-MS/MS

SCHOLARONE™
Manuscripts

Wiley-VCH