UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Papel imunomodulador da interleucina-17 na resposta inflamatória intestinal e metabólica no diabetes do tipo 2.

Malena Martínez Pérez

RIBEIRÃO PRETO-SP
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Papel imunomodulador da interleucina-17 na resposta inflamatória intestinal e metabólica no diabetes do tipo 2.

Malena Martínez Pérez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Nome do Orientador: Prof. Dra. **Daniela Carlos Sartori**

RIBEIRÃO PRETO-SP
2016

Autorizo a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Martínez Pérez,M.

Papel imunomodulador da interleucina-17 na resposta inflamatória intestinal e metabólica no diabetes do tipo 2.

100p: iL; 30 cm

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Daniela Carlos Sartori

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Células Th17. 3. Microbiota intestinal. 4. Inflamação intestinal. 5. Resistência à insulina.

Nome: Malena Martínez Pérez

Título: Papel imunomodulador da interleucina-17 na resposta inflamatória intestinal e metabólica no diabetes do tipo 2.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Dedicatória...

Aos meus pais, Daysi Pérez Cárdenas e Carlos Eusebio Martínez Juvier pelo apoio incondicional e fundamental para meu desenvolvimento pessoal e intelectual, ainda na distancia. A eles muito obrigada.

Agradecimentos

A Dra. Daniela Carlos Sartori, pela excelente orientação e por todos os ensinamentos técnicos, científicos e pessoais. A ela devo todas as oportunidades que me surgiram nestes dois anos dedicados à Imunologia. Meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Professor Dr. João Santana da Silva, pela excelente acolhida, não unicamente no Laboratório de Imunoparasitologia, mas por abrir as portas de sua casa e me receber. Pelos ensinamentos, orientação e por sempre proporcionar aos alunos o melhor possível. Ao senhor, toda minha admiração e carinho.

A Maria Fernanda, por seu amizade e carinho quase maternal. Obrigada por seus conselhos e por estar sempre presente quando mais precisei de você.

A minha grande amiga Larissa Marfori, pessoa brilhante e que esteve presente na execução da maioria dos experimentos realizados durante este trabalho. Muito obrigada por todo.

Ao meu grande amigo brasileiro Murilo Solano Dias, pessoa muito especial e querida. Obrigada pela imensa ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho e também pela amizade !Muchas gracias!

Ao meu amigo Msc.Rodrigo Pereira de Almeida Rodrigues, pela amizade sem igual e pela imensa ajuda prestada na fase inicial deste trabalho. Ainda que distante, muito obrigada

A Professora Dra. Gabriela Gonçalves Oliveira pela parceria científica, amizade e imenso carinho e por estar presente nos momentos mais difíceis de minha estada aqui no Brasil.

A Professora. Dra Vânia Luiza Deperon Bonato e a Professora Dra. Isabel Kinney Ferreira pelos excelentes ensinamentos, carinho e dedicação ao desenvolvimento cientifico, professional e pessoal dos alunos do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

A família Rosa e em especial ao meu esposo Renato Rosa da Silva pelo seu carinho incondicional, paciência infinita e pela força durante a realização deste trabalho. Para ele meu mais sincero agradecimento.

Aos amigos de laboratório, Alynne Karen, Mikael Haruro, Dr. Gaurav Gupta, Msc. Manuela Sales, Gretel Rodríguez Rodríguez, Ítala Silva, Pedro Alexandre Sampaio, Mariana Tomaz, Dra. Carla Duque Lopes, Msc. Laís Sacramento, Msc. Frederico Ribeiro, Jessica Baleia, Dra. Fabrine Massafera Dias, Camila Oliveira, Msc. Gabriela Pessenda, Dra. Denise Morais da Fonseca, Dra. Luciana Benevides, Dra. Maria Cláudia Silva, Msc. Marcela Davoli Ferreira, Amanda Goulart, Msc.Sandra Palma, Amanda Zangirolamo, Josiane Carvalho, pelo companheirismo na ciência e na amizade. Muito obrigado por tudo!

À todos os colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular muito obrigada e em especial meus agradecimentos para a Professora Dra. Rita de Cássia Tostes Passaglia e a Msc. Camila Pereira pela ajuda incondicional prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Ao todos os colegas e amigos do Laboratório de Vacinas Gênicas, e em especial a Izaíra Tincani, Wendy Martin e Ana Paula Masson pela parceria científica, amizade sem igual e carinho infinito. À elas, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos funcionários Wander Cosme Ribeiro, Cristiani Milanezi, Denise Ferraz, Ana Flávia, Rubilan Quioneiro, Edinelson, Júlio Anselmo Siqueira, Olinda Mara, Dorlei Santos, Elaine e em especial para a secretaria de todos os tempos do programa de Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine, pela eficiência e destreza nos serviços prestados, sem eles a realização deste trabalho não seria possível. Muito obrigada a todos!

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada por os ensinamentos e a orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste trabalho - Processo 2104/21020-2.

APOIO SUPORTE E FINANCIAMENTO

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia, coordenado pelo Professor João Santana da Silva - Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

- Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)- Processo 2014/21020-2

A grande tragédia da ciência: o massacre de uma bela hipótese por parte de um horrível fato.´´

(Thomas Huxley)

Martínez Pérez, M. **Papel imunomodulador da interleucina-17 na resposta inflamatória intestinal e metabólica no diabetes do tipo 2.**
Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2016, 100 pg.

Resumo

O trato gastrointestinal é um sítio de alta exposição antigênica, por isso requer a presença de mecanismos de regulação imunológica mediada por linfócitos T reguladores e T auxiliares produtores de IL-17 (Th17) na mucosa intestinal. Se houvera falha na indução desses mecanismos, pode ocorrer o desequilíbrio das populações de bactérias comensais da microbiota intestinal, denominado de disbiose, geralmente associado à ruptura da barreira intestinal e translocação de bactérias ou LPS para o sangue. Neste sentido, alguns estudos têm evidenciado a importância dos linfócitos Th17 no intestino, já que estas células tem a capacidade de manter a integridade da barreira intestinal e, como conseqüência controlar a colonização e translocação bacteriana. Em adição, em pacientes e animais diabéticos têm sido observada a correlação de altos níveis de LPS circulantes e resistência à insulina. Baseado nessas evidências, nosso objetivo foi avaliar o papel da citocina IL-17 no controle das alterações inflamatórias e metabólicas no modelo de diabetes do tipo 2 (DM2). Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes do receptor da citocina IL-17 (IL-17R$^{-/-}$) submetidos à dieta controle (DN), composta por 10% de gorduras, 70% de carboidratos e 20% de proteínas ou à dieta hiperlipídica (DH), composta por 60% de gorduras, 20% de carboidratos e 20% de proteínas. Nossos dados demonstraram que a deficiência do receptor de IL-17 protegeu os animais contra a obesidade, mas os mesmos desenvolveram maior hiperglicemia e hiperinsulinemia decorrente da resistência à insulina. Além disso, foi verificada a hiperplasia das ilhotas pancreáticas, anormalidades na arquitetura e intenso infiltrado inflamatório no intestino (íleo) dos animais IL-17R$^{-/-}$ comparados aos WT após DH. Esse fato parece estar correlacionado a um defeito da migração de neutrófilos para a mucosa intestinal, uma vez que foi detectada reduzida expressão gênica da quimiocina CXCL-1 e do receptor CXCR-2 no íleo desses animais. De maneira interessante, as populações de neutrófilos (CD11b^{+}Ly6G^{+}) e de macrófagos anti-inflamatórios (CD11b^{+}CX3CR1^{+}) mostraram-se aumentadas nos linfonodos mesentéricos dos animais IL-17R$^{-/-}$ após DH. Em seguida, foi constatada maior translocação bacteriana no sangue tanto de animais IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DN como DH. Entretanto, a análise metagenômica do gene 16S revelou a prevalência de bactérias *Bacteroidetes* e *Proteobacterias,* principais representantes de bactérias gram-negativas, somente nas fezes dos animais IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH. Em conjunto, estes dados indicam que o eixo IL-17/IL-17R é importante na manutenção da homeostase intestinal e na regulação das alterações inflamatórias e metabólicas associadas ao DM2.

Palavras chaves: Diabetes mellitus tipo 2; Células Th17; Microbiota intestinal; Inflamação intestinal; Resistência à insulina.

Pérez Martinez, M. **Immunomodulator role of intestinal interleukin-17 in inflammatory and metabolic responses in type 2 diabetes.**
Masters dissertation. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2016, 100 pg.

Abstract

The gastrointestinal tract is a high antigenic exposure site, so it requires the presence of immune regulation mechanisms mediated by regulatory T lymphocytes and IL-17-producing T helper lymphocytes (Th17) in the intestinal mucosa. If there is a failure in the induction of these mechanisms, may occur the imbalance in the populations of commensal bacteria of the intestinal microbiota, called dysbiosis, generally associated with the break of the intestinal barrier and translocation of bacteria or their products like LPS into the blood. In this regard, some studies have evidenced the importance of Th17 lymphocytes in the intestine, since these cells have the ability to maintain the integrity of the intestinal barrier, and consequently controlling the colonization and bacterial translocation. In addition, in patients and diabetic animals have been observed correlation between high circulating levels of LPS and insulin resistance. Based on this evidence, our objective was to evaluate the role of IL-17 cytokine in the control of inflammatory and metabolic changes in the type 2 diabetes (T2DM). For this reason, were used C57BL/6 wild-type mice (WT) or lacking of IL-17 cytokine receptor (IL-17R$^{-/-}$) mice undergoing to the control diet (ND) comprising 10% fat, 70% carbohydrate and 20% protein or high fat diet (DH), comprising 60% fat, 20% carbohydrates and 20% protein. These data demonstrate that IL-17 receptor deficiency protected the animals against obesity, but these mice developed hyperglycemia and hyperinsulinemia due to insulin resistance. Furthermore, we verified a hyperplasia of the pancreatic islets, abnormalities in architecture and intense inflammation in the intestine (ileum) of IL-17R$^{-/-}$ animals undergoing DH compared to WT. This appears to be correlated to a defect in the neutrophil migration to the intestinal mucosa, since was detected reduced gene expression of the CXCL-1 chemokine and CXCR-2 receptor in the ileum of these animals. Interestingly, the populations of neutrophils (CD11b^{+}Ly6G^{+}) and anti-inflammatory macrophages (CD11b^{+}CX3CR1^{+}) were shown to be increased in the mesenteric lymph nodes of IL-17R$^{-/-}$ animals after DH. Later, it was found more bacterial translocation in blood, both in IL-17R$^{-/-}$ mice with ND or DH. However, the metagenomic analyzes of the 16S gene revealed increased of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* phyla, the main representatives of gram-negative bacteria, only in the faeces of IL-17R$^{-/-}$ mice underwent DH. Together, these data indicate that IL-17/IL-17R axis is important in maintaining intestinal homeostasis and the regulation of inflammatory and metabolic alterations associated to T2DM.

Key words: Type 2 diabetes mellitus; Th17 cells; Intestinal microbiota; Intestinal inflammation; Insulin resistance.

Lista de Figuras

Figura 1: Expressão gênica e protéica das citocinas IL-6, IL-17A e IL-22 no íleo de animais WT após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....47

Figura 2: Identificação de células produtoras de IL-17 nos linfonodos mesentéricos (LNM) e lâmina própria (LP) de camundongos WT após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....49

Figura 3: Porcentagem e número absoluto de células na lâmina propria (LP) de camundongos WT após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....51

Figura 4: Parâmetros nutricionais de animais WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....53

Figura 5: Parâmetros metabólicos de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica(DH).....55

Figura 6: Expressão total e fosforilação de PI3K e AKT no músculo de camundongos WT e IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....58

Figura 7: Cortes histológicos do pâncreas de camundongos WT ou IL-17R $^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....60

Figura 8: Cortes histológicos do fígado e intestino delgado (íleo) de camundongos WT ou IL-17R $^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....62

Figura 9: Expressão gênica e protéica das quimiocinas CXCL-1, CXCL-2 e do receptor CXCR-2 no íleo de camundongos WT e IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....64

Figura 10: Porcentagem e número absoluto de células nos linfonodos mesentéricos (LMN) de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....67

Figura 11: Análise da permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e níveis de LPS no sangue de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....70

Figura 12: Expressão gênica das proteínas claudina-2, ocludina, mucina-1 e mucina-2 no íleo de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....72

Figura 13: Abundância relativa das bactérias presentes nas fezes de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH).....75

Figura 14: Expressão gênica do receptor de IL-17 e protéica das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 no sobrenadante da cultura de células epiteliais (CE) e da lâmina própria intestinal (LP).....77

Lista de abreviaturas

DM2- Diabetes do tipo 2

OMS- Organização Mundial de Saúde

TNF-α- Fator de necrose tumoral alfa

LPS- Lipopolisacarídeo bacteriano

IR- Receptor de insulina

IRS- Substrato do receptor da insulina

IFN-γ- Interferon gama

TAV -Tecido adiposo visceral

GLUT-4 -Transportador de glicose de tipo 4

JAK - Janus quinase

SOCS - Proteína supressora da sinalização de citocinas

WT - do inglês *Wild type*, ``Tipo Selvagem´´

IL-17R$^{-/-}$- Camundongo deficiente do receptor da interleucina IL-17

DN - Dieta controle

DH - Dieta hiperlipídica

Th17 - Células T auxiliares produtoras de IL-17

Th1- Células T auxiliares de tipo 1

Treg - Células T reguladoras

PI3K - Fosfatidilinositol 3- quinase

TJ - do inglês tight-junctions, ``junções estreitas´´

JAM - Moléculas de adesão celular

TLR - Receptor de tipo toll

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LP - Lâmina própria intestinal

DC - Células dendríticas

PP - Placas de Peyer

LF - Folículos linfóides

LMN - Linfonodo mesentérico

TGF-β - Fator de crescimento transformante beta

ATP - Trifosfato de adenosina

IL-23R - Receptor da citocina IL-23

G-SCF - Fator estimulador de colônias de granulócitos

IA - Ingestão alimentar

IC - Ingestão calórica

GTT - Teste de tolerância à glicose

ITT - Teste de tolerância à insulina

ELISA - Ensaio imunoenzimático

CE - Células endoteliais

SFB - Soro fetal bovino

CT - Ciclo limiar

BHI - do inglês *Brain Heart Infusion Agar*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

LTi - Linfócitos inatos

HE - Hematoxilina/eosina

NGAL - Proteína lipocalina induzida por gelatinase do neutrófilo

ILC - Células linfóides inatas

UFC - Unidades formadoras de colônias

Muc-1 - Mucina 1

Muc-2 - Mucina 2

IL-17r - IL-17 recombinante

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

IL - Interleucina

PE - Ficoeritrina

Percp– Peridinina clorofila

CD - do inglês *Cluster of differentiation*, ``Cluster de diferenciação´

PMA - Forbol miristato 12 acetato

RPMI - Meio de cultura celular 1640

cDNA - DNA complementar

Tyr- Tirosina

Ser- Serina

IKK2- Subunidade 2 do complexo IkB quinase

JNK- Quinase c-Jun N-terminal

SPF- Livre de patógenos específicos

SBF- Bactérias filamentosas segmentadas

mRNA- RNA mensageiro

CXCL-1- Ligando 1 da quimiocina CXC

CXCL-2- Ligando 2 da quimiocina CXC

MAP quinases- Quinases ativadas por mitógeno

REGIIIγ- Membro 3 da família de proteínas relacionadas à regeneração

Sumário

Lista de Figuras.....13
Lista de Abreviaturas.....15
1. Introdução.....21
1.1 Resposta inflamatória na indução da resistência à insulina e DM2.....22
1.2 Permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica no DM2.....25
1.3 Evidências de disbiose intestinal na obesidade e DM2.....26
1.4 Células da imunidade inata no intestino.....28
1.5 Diferenciação e ativação das células Th17 intestinais.....31
1.6 Importância das células Th17 na mucosa intestinal.....32
2. Objetivos.....35
2.1 Geral.....35
2.2 Específicos.....35
3. Material e Métodos.....37
3.1 Animais.....37
3.2 Indução de diabetes do tipo 2 (DM2).....37
3.3 Perfil nutricional.....37
3.4 Testes da tolerância à glicose (GTT) e insulina (ITT).....38
3.5 Quantificação de insulina no soro.....38
3.6 Quantificação de colesterol e triglicerídeos no soro.....38
3.7 Avaliação da expressão e fosforilação da AKT e PI3K no músculo.....39
3.8 Extração de células da lâmina própria e células endoteliais intestinais.....39
3.9 Análise de leucócitos por citometria de fluxo.....40
3.10 Estimulação de células da lâmina própria e células endoteliais intestinais com IL-17 recombinante.....41
3.11 Extração de RNA.....41
3.12 Reações de PCR em tempo real.....41
3.13 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....42
3.14 Estudos da permeabilidade intestinal pela análise de FITC-Dextran.....42
3.15 Avaliação da translocação bacteriana por contagem das unidades formadoras de colônias.....43
3.16 Dosagem de LPS no soro.....43

3.17 Análise metagenômica (seqüenciamento).....43
3.18 Análise histopatológica.....44
3.19 Análises estatísticas.....44
4. Resultados.....46
4.1 Cinética de expressão gênica e protéica de citocinas do perfil Th17 no íleo.....46
4.2 Caracterização das populações celulares produtoras de IL-17 nos LMN e LP intestinal.....48
4.3 Correlação com o recrutamento de neutrófilos e macrófagos na LP intestinal.....50
4.4 Contribuição da IL-17 no desenvolvimento da obesidade.....52
4.5 Efeito da IL-17 na regulação das alterações metabólicas no DM2.....54
4.6 Efeito da IL-17 no controle da resistência à insulina e DM2.....56
4.7 Efeito da IL-17 na hiperplasia e lesão pancreática no DM2.....59
4.8 Efeito da IL-17 na deposição de gordura hepática e inflamação intestinal.....61
4.9 Efeito da IL-17 na expressão de receptores e quimiocinas no intestino.....63
4.10 Efeito da IL-17 na modulação do processo inflamatório no intestino.....65
4.11 Efeito da IL-17 na permeabilidade intestinal e translocação bacteriana.....68
4.12 Efeito da IL-17 na expressão de proteínas de adesão e junção celular.....71
4.13 Efeito da IL-17 na composição da microbiota intestinal.....73
4.14 Efeito da DH na expressão do receptor de IL-17 em células epiteliais e da LP intestinal.....76
5.Discussão.....79
6. Conclusões.....89
7.Referências.....91

1. Introdução

1. Introdução

A obesidade é um processo caracterizado pelo acúmulo excessivo de lipídeos no tecido adiposo associado a uma inflamação crônica de baixo grau, decorrente da ativação de células do sistema imune inato e adaptativo (Qatanani and Lazar 2007; Cildir, Akincilar et al. 2013; Kammoun, Kraakman et al. 2014). Essa desordem tem sido considerada uma das principais causas relacionada ao desenvolvimento de outras comorbidades como o diabetes do tipo 2 (DM2), assim como doenças cardiovasculares e renais (Qatanani and Lazar 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 4% da população mundial (135 milhões de pessoas) apresentou diagnóstico positivo para diabetes em 1995, e as projeções para 2025 indicam que esse percentual pode chegar a 5,4%, totalizando cerca de 300 milhões de pessoas diabéticas no mundo. No Brasil, essa prevalência teve uma média geral ajustada pela idade dos indivíduos de 7,4% em um estudo realizado em nove capitais brasileiras (Carmecini 2012).

Os mecanismos imunológicos e metabólicos que conectam a obesidade com a inflamação no DM2 incluem a produção de uma variedade de moléculas como adipocinas, quimiocinas e citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), IL-1β e IL-6 pelos adipócitos e células do sistema imune residentes no tecido adiposo. As citocinas pró-inflamatórias promovem a resistência à insulina nos tecidos nos quais são sintetizadas (tecido adiposo e fígado), mas também podem ser transportadas pelo sangue e influenciar órgãos distantes como vasos sanguíneos, músculo cardíaco e esquelético, rins e leucócitos circulantes. Além disso, tem sido reportado em humanos obesos e modelos experimentais de obesidade, que elevadas taxas de ácidos graxos livres no soro induzem sinalização pró-inflamatória e resistência à insulina em tecidos periféricos (Boden, She et al. 2005).

Várias evidências mais recentes demonstram que a microbiota intestinal está relacionada aos perfis inflamatórios na obesidade e DM2 (Cani, Bibiloni et al. 2008; Cani and Delzenne 2009). Diferentemente do genoma humano, o genoma de microrganismos presentes na microbiota intestinal é passível de alterações dinâmicas na configuração de seus componentes com o intuito de adaptação de um

componente individual ou de uma comunidade em resposta ao tipo de alimentação, alguma anormalidade ou uso de antibióticos. De fato, estudos têm reportado a presença de alterações nas populações de bactérias presentes no intestino de indivíduos e animais obesos (Tagliabue and Elli 2013). O desequilíbrio da microbiota pode levar a ruptura da barreira intestinal, aumento da permeabilidade e translocação bacteriana à partir do intestino para tecidos sensíveis à insulina (Amar, Chabo et al. 2011). Neste sentido, concentrações aumentadas de componentes bacterianos provenientes de bactérias gram-negativas como o lipopolisacarídeo (LPS) têm sido detectadas na obesidade e DM2. Este fenômeno é denominado de endotoxemia metabólica e decorre da ativação de receptores da imunidade inata, como o complexo CD14/TLR4 expresso em células do sistema imune inato e nos adipócitos, resultando na ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias. Dentre as principais citocinas produzidas durante a endotoxemia metabólica estão o TNF-α e a IL-6, que induzem a inativação de componentes da cascata de sinalização da insulina e conferem a resistência à insulina e progressão do DM2 (Cani and Delzenne 2009; Cani, Osto et al. 2012).

1.1 Resposta inflamatória na indução da resistência à insulina e DM2.

A insulina é o principal hormônio que regula o metabolismo da glicose e inicia seus efeitos biológicos através da ativação do receptor de insulina (IR), que ocorre pela autofosforilação de resíduos de tirosinas (Tyr) de vários substratos, tais como substrato do receptor da insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2, respectivamente). Após a fosforilação da tirosina, o IRS-1 e IRS-2 podem se ligar e ativar a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a qual promove a fosforilação em resíduos de serina (Ser) de outra quinase denominada Akt. A Akt ativada promove uma série de cascatas de fosforilação/desfosforilação em diversos substratos e enzimas. Esses eventos culminam na captação da glicose circulante pelo músculo e tecido adiposo mediado pelo transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4) (Schinner, Scherbaum et al. 2005; Winkler and Cseh 2009).

O diabetes é caracterizado pelos níveis elevados de glicose sanguínea, como resultado de secreção de insulina insuficiente para o organismo, ou ainda resistência

à insulina, sendo caracterizada como uma doença heterogênea com múltiplas etiologias (Ashcroft and Rorsman 2012). O DM2 contribui com 80-95% dos casos de diabetes diagnosticados em países desenvolvidos. Embora as razões para o desenvolvimento ainda não serem conhecidas, alguns fatores de risco podem desencadear a doença, tais como a obesidade, a alimentação inadequada, o sedentarismo, o envelhecimento e o histórico familiar de diabetes (Guariguata, Whiting et al. 2014). A resistência à insulina precede o início do DM2, definida como uma irresponsividade à ação deste hormônio em tecidos metabólicos (Gual, Le Marchand-Brustel et al. 2005)**,** e esta condição patológica está fortemente associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes como o TNF-α, interferon gama (IFN-γ) e IL-6 (Cildir, Akincilar et al. 2013)**.**

A obesidade é caracterizada por ter um número maior de tecido adiposo (hiperplasia) e um aumento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia). Recentemente estudos têm implicado o tecido adiposo visceral (TAV) no processo inflamatório, demonstrando que os adipócitos maduros e pré-adipócitos expressam múltiplos receptores do tipo toll (TLR). No TAV, os macrófagos representam cerca de 40-50% do total de células presentes neste compartimento. Em indivíduos obesos, os macrófagos são caracterizados pela expressão de TNF-α e IL-6 e são denominados como macrófagos classicamente ativados ou M1. Neste contexto, a diferenciação dos macrófagos M1 é induzida por IFN-γ produzido por sub-populações de células Th1 e $TCD8^+$ que infiltram o TAV durante o desenvolvimento do processo inflamatório. Além disso, existe a correlação entre o aumento do número de células Th1 e subsequente produção de IFN-γ com a diminuição da sensibilidade à insulina no TAV (Nishimura, Manabe et al. 2009; Oh, Morinaga et al. 2012).

De maneira controversa, um estudo mais recente mostrou que a IL-6 produzida pelo músculo esquelético durante a realização de um exercício físico intenso é favorável para manter níveis normais de glicose no sangue (BK 2007). Posteriormente, foi descrito uma via anti-inflamatória homeostática para a IL-6, uma vez que ela foi capaz de induzir a expressão do receptor da IL-4 em macrófagos isolados de camundongos submetidos à dieta rica em gorduras, o que favorece a polarização destas células para um fenótipo alternativamente ativado ou M2. Em paralelo, foi comprovado que camundongos deficientes de IL-6R apresentaram

melhora da sensibilidade à insulina e redução da endotoxemia metabólica após dieta rica em gorduras (Mauer, Chaurasia et al. 2014).

Apesar de que o papel do IFN-γ no tecido adiposo ainda não está bem esclarecido, alguns estudos sugerem que essa citocina modula o metabolismo oxidativo e a formação de novos vasos, o que favorece o recrutamento e ativação de macrófagos no TAV (Vijay-Kumar, Aitken et al. 2010; Oh, Morinaga et al. 2012). Além disso, o TNF-α liberado pelos macrófagos ativados presentes no TAV se liga a seu receptor, promovendo a ativação de uma série de quinases como IKK2 e JNK, que conduzem a fosforilação do IRS-1 e IRS-2 em resíduos de serina e inibem a cascata de sinalização da insulina nos adipócitos. Como decorrência, a expressão do GLUT-4 é regulada negativamente na superfície da membrana plasmática destas células (Stephens and Pekala 1991; Gual, Le Marchand-Brustel et al. 2005; Qatanani and Lazar 2007; Cildir, Akincilar et al. 2013). Sendo assim, as citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo próprio tecido adiposo e pelas células do sistema imune residentes durante um processo de obesidade parecem contribuir para a indução da resistência à insulina e DM2.

Diversos mecanismos diretos e indiretos têm sido relacionados à ação das citocinas pró-inflamatórias na resistência à insulina. A sinalização mediada pela IL-6 induz a ativação de enzimas como as janus quinases (JAKs), que por sua vez ativam as proteínas supressoras da sinalização de citocinas 1 e 3 (SOCS 1 e 3, respectivamente) e leva a inibição da fosforilação de resíduos de tirosina dos IRS. Adicionalmente, foi mostrado que tanto o TNF-α como a IL-6 inibe a transcrição dos genes relacionados com a expressão dos IRS e de GLUT-4 nos adipócitos (Rotter, Nagaev et al. 2003; Cildir, Akincilar et al. 2013). Outros efeitos biológicos decorrentes da sinalização dessas citocinas é o aumento da lipólise no TAV e, como consequência, há liberação de altos níveis de ácidos graxos livres no plasma, os quais inibem a fosforilação em resíduos de tirosina do IRS-1 e a ativação da quinase PI3K (Zhang, Halbleib et al. 2002; Gual, Le Marchand-Brustel et al. 2005).

1.2 Permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica no DM2.

A obesidade e o DM2 são duas doenças metabólicas resultantes da combinação de fatores genéticos e ambientais. Embora alguns dos mecanismos moleculares associados aos fatores genéticos tenham sido elucidados, ainda pouco se sabe sobre a interferência dos fatores ambientais (Cani, Delzenne et al. 2008). Nos últimos anos, estudos revelaram que a ingestão de dieta rica em lipídeos está intimamente relacionada a mudanças na microbiota intestinal e na arquitetura normal da barreira intestinal, as quais podem ser uma das causas de aumento de peso corporal, resistência à insulina e progressão do DM2 (Erridge, Attina et al. 2007; de La Serre, Ellis et al. 2010).

Em condições normais, o epitélio gastrointestinal é formado por uma camada de células epiteliais, que permitem uma absorção eficiente de nutrientes pelo organismo e, ao mesmo tempo, constitui uma barreira física que impede o transporte de sustâncias nocivas da região luminal do intestino para a circulação sanguínea e tecidos adjacentes (Suzuki 2013). Esta permeabilidade seletiva é mantida principalmente pelas uniões intercelulares estreitas que se estabelecem entre as células epiteliais, denominadas de *tight-junctions* (TJ). As TJ são complexos protéicos formados por proteínas transmembranas tais como a claudina, ocludina e as moléculas de adesão juncional (JAM), assim como um amplo espectro de moléculas citosólicas como as proteínas ZO.

Estas TJ são dinamicamente reguladas por diferentes fatores externos, como por exemplo, os diversos tipos de dietas alimentares. Estudos recentes demonstraram que camundongos alimentados com uma dieta rica em gorduras apresentaram alterações na permeabilidade intestinal, já que foi observado uma diminuição da expressão das proteínas ZO-2, claudina 1 e 3 e JAM-1 no cólon de destes animais quando comparados com os camundongos que receberam dieta controle. Além disso, esta permeabilidade foi associada com um aumento do peso corporal e maior intolerância à glicose (Moreira, Texeira et al. 2012; Murakami, Tanabe et al. 2016). Adicionalmente, foi constatado que a dieta rica em gorduras também induziu alterações na composição da população microbiana presente no intestino provocando um aumento do número de bactérias gram-negativas em

detrimento das gram-positivas. Essas modificações acarretaram um aumento considerável dos níveis de LPS, assim como uma quebra da barreira intestinal, que levou ao extravasamento desta molécula para a circulação sanguínea (Moreira, Texeira et al. 2012). A presença de LPS na circulação e nos tecidos metabólicos possibilita a sua interação com receptores de tipo *toll,*como o TLR4 presente na superfície da membrana de numerosas células do sistema imune e outras células não imunes como adipócitos, hepatócitos e células endoteliais. Quando o LPS se liga ao TLR4 ocorre a ativação de uma série de vias de sinalização pró-inflamatórias, que culminam na produção de citocinas como IL-6, TNF-α e a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), as quais promovem um estado de inflamação e resistência à insulina (de La Serre, Ellis et al. 2010; Moreira, Texeira et al. 2012; Serino, Luche et al. 2012).

Portanto, esses achados comprovam que o consumo de uma dieta rica em gorduras é capaz de desencadear mudanças na permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica, que correlacionam com o estabelecimento da inflamação, resistência à insulina e desenvolvimento de DM2.

1.3 Evidências de disbiose intestinal na obesidade e DM2.

Durante os últimos cinco anos, os estudos relacionados com a interação entre a população de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal e o hospedeiro têm alcançado grande relevância. Sabe-se que o intestino humano é colonizado por aproximadamente 10^{13} a 10^{14} tipos de bactérias, chegando a ser considerado como um órgão microbiano dentro do organismo do hospedeiro (Cani and Delzenne 2009; Li and Hotamisligil 2010). Notavelmente, sabe-se que a microbiota intestinal está envolvida em numerosas funções biológicas intestinais, como por exemplo: na defesa do hospedeiro frente a patógenos invasores, no desenvolvimento da imunidade de mucosas, das microvilosidades intestinais e na degradação de polissacarídeos não digeríveis como a inulina (Cani and Delzenne 2009).

Estudos mais recentes mostram o envolvimento da microbiota intestinal no ganho de peso corporal. Neste sentido, um estudo mostrou que o transplante fecal da microbiota de camundongos obesos mantidos em condições livres de patógenos

específicos (SPF) para camundongos *germ-free* ocasionou o aumento de 60% no peso corporal destes animais (Backhed, Ding et al. 2004). Em adição, outro estudo observou que o desenvolvimento de obesidade tem sido associado a mudanças na composição e proporção das populações bacterianas presentes na microbiota intestinal, processo denominado de disbiose intestinal (Cani and Delzenne 2009). Neste sentido, foi observado que tanto em modelos animais de obesidade como em humanos com sobrepeso, existe uma proporção diferencial em 2 filos principais de bactérias: maior abundância de *Firmicutes* e menor de *Bacteroidetes* quando comparados com os controles magros (Cani and Delzenne 2009; Cani and Delzenne 2009; Frazier, DiBaise et al. 2011).

De maneira interessante, o consumo de uma dieta rica em lipídeos também foi associado com uma redução da abundância relativa das bactérias *Bifidobacterium* (Cani and Delzenne 2009). De fato, alterações dessas bactérias estão correlacionadas ao aumento da capacidade de obtenção de energia e o aumento dos níveis de LPS circulantes, o que leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório sistêmico de baixo grau e resistência à insulina (Cani and Delzenne 2009). Corroborando com esses dados, foi demonstrado que a prevalência de *Bifidobacterium* no intestino está associada à diminuição dos níveis de LPS, melhora da barreira intestinal e redução de ganho de peso corporal (Cani and Delzenne 2009; Cani and Delzenne 2009; Shen, Obin et al. 2013).

Apesar da maioria dos estudos constatarem a diminuição da razão de *Bacteroidetes/Firmicutes* em pacientes obesos ou com DM2, existem outros resultados que sugerem dados contrários a estes já estabelecidos na literatura (Wu, Ma et al. 2010; Serino, Luche et al. 2012). Contudo, diversas evidências reforçam a hipótese de que a microbiota intestinal constitui um elemento chave no desenvolvimento de doenças metabólicas. De fato, foi demonstrada reduzida inflamação no tecido adiposo e normalização dos parâmetros metabólicos relacionados à obesidade e DM2 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com antibióticos (Cani, Bibiloni et al. 2008).

É importante mencionar que a presença de filos específicos de bactérias no intestino é importante para a diferenciação na lâmina própria intestinal (LP) de determinadas sub-populações de células do sistema imune relacionadas com a

manutenção da homeostase intestinal, tais como as células T auxiliares produtoras de IL-17 (Th17). Um estudo recente reportou que a diferenciação destas células na lâmina própria está estreitamente relacionada com a presença de dois filos principais de bactérias, *Citophaga-Flavobacter-Bacteroidetes*e e as bactérias *Filamentosas Segmentadas* (SBF). Entretanto, a abundância relativa destes microrganismos mostrou-se diminuída durante o desenvolvimento de obesidade (Ivanov, Frutos Rde et al. 2008). Sendo assim, essas observações indicam um papel importante da microbiota intestinal na regulação de processos biológicos e metabólicos, tais como a homeostase intestinal, ganho de peso corporal, obesidade e DM2.

1.4 Células da imunidade inata no intestino.

O arsenal de células do sistema imune presentes na LP tem um papel fundamental no reconhecimento de patógenos invasores e antígenos alimentares, contribuindo assim para a manutenção da tolerância e homeostase intestinal. Além disso, estas células presentes na LP precisam manter uma relação de simbiose com a microbiota intestinal, onde a microbiota regula o número e a função de determinadas populações de células do sistema imune, assim como estas células mantêm o controle da microbiota intestinal ao induzir a produção de peptídeos antimicrobianos e imunoglobulinas com a IgA (Farache, Zigmond et al. 2013). Sabe-se que existe uma série de sub-populações de células que reconhecem antígenos provenientes das bactérias comensais e, após sua ativação, são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias. Os fagócitos mononucleares, incluindo células dendríticas (DCs) e macrófagos, são as principais células que contribuem na manutenção da integridade do intestino através da ativação das respostas imunes inatas e adaptativas necessárias para a tolerância a antígenos alimentares, microrganismos comensais e agentes patogênicos (Johansson-Lindbom, Svensson et al. 2005). As DCs estão distribuídas na LP, assim como em órgãos linfóides associados ao intestino, entre os que se incluem: as placas de Peyer (PPs), os folículos linfóides (LFs) e os linfonodos mesentéricos (LMNs).

As DC são caracterizadas pela presença em suas membranas plasmáticas das integrinas CD11c, CD103 e, mais recentemente, pela integrina CD11b (Varol,

Vallon-Eberhard et al. 2009). Inicialmente, foi observado que as DCs $CD11b^{+}CD103^{+}$ e as DCs $CD11b^{-}CD103^{+}$ apresentavam uma distribuição diferenciada nas regiões proximal e distal do intestino, sugerindo funções diferentes para cada um destes subtipos celulares de DCs. Também foi reportado a prevalência das DCs $CD11b^{-}$ $CD103^{+}$ nas PPs, LFs, LP e na linfa do conduto torácico após uma linfadenectomia mesentérica nos camundongos, indicando que estas são as principais células com capacidade de migrar para os LMNs através de um mecanismo dependente do receptor de quimiocina CCR7. Estas células parecem ser importantes para a indução de tolerância oral, assim como para a diferenciação e expansão de células $TCD4^{+}$ nos LMNs. Também foi descrito que essas DCs parecem estar envolvidas na supressão de colite induzida por células T reguladoras (Treg) (Varol, Vallon-Eberhard et al. 2009; Persson, Scott et al. 2013).

Já as DC $CD11b^{+}CD103^{+}$ foram encontradas no núcleo das microvilosidades intestinais e no interior da LP, locais que não favorecem a captação de antígenos luminais (Schulz, Jaensson et al. 2009). No entanto, outros estudos relataram a presença de DCs $CD11b^{+}CD103^{+}$ dentro do epitélio intestinal, cuja localização permitiria a emissão de projeções de sua membrana plasmática e captação de antígenos do lúmen intestinal (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009). Adicionalmente, Kinnebrew e colaboradores mostraram que as DCs $CD11b^{+}CD103^{+}$ expressam a citocina IL-23 em resposta a flagelina na LP, e desta forma, contribuem para a diferenciação de células Th17 (Kinnebrew, Buffie et al. 2012). Por outro lado, essas células também são capazes de produzir o fator de crescimento transformante beta (TGF-β), o qual está envolvido na diferenciação de células T naive em células Tregs, e de células B em células plasmáticas produtoras de IgA (Mora, Iwata et al. 2006).

Os mácrofagos representam a população de fagócitos mononucleares mais abundantes na LP (Lee, Starkey et al. 1985)**.** Estas células se caracterizam pela expressão de marcadores como CD11b, CD11c, F4/80 e alta expressão do receptor de quimiocina CX3CR1 (Farache, Zigmond et al. 2013). Essas células são capazes de reconhecer as bactérias comensais que ultrapassam a barreira epitelial e produzir citocinas anti-inflamatórias (Bain and Mowat 2011). Neste contexto, foi descrito que animais deficientes de CX3CR1 são incapazes de estabelecer a tolerância oral devido a diminuição da população de células Tregs e produção de IL-10 na LP

intestinal (Hadis, Wahl et al. 2011). Outro fato interessante é que os macrófagos CX3CR1^{+} não expressam o receptor de quimiocina CCR7, o qual é necessário para a migração destas células do intestino para os LMNs, por isso, são considerados macrófagos residentes da LP intestinal (Schulz, Jaensson et al. 2009). Não obstante, foi visto que estes macrófagos são capazes de promover a diferenciação e manutenção da população de células Th17 intestinais através de um mecanismo dependente do trifosfato de adenosina (ATP) produzido pelas bactérias SBF presentes no intestino (Atarashi, Nishimura et al. 2008).

Outras células do sistema imune que parecem ter um papel importante na regulação da homeostase intestinal são os neutrófilos. Estas células são os leucócitos mais abundantes no sangue e apresentam uma maquinaria antimicrobiana potente contra patógenos invasores. Durante a inflamação intestinal, os monócitos residentes na LP liberam quimiocinas que favorecem o recrutamento de neutrófilos a partir do sangue até o sítio de infecção (Ajuebor, Das et al. 1999). Uma vez que os neutrófilos chegam ao intestino, também produzem quimiocinas que ajudam no recrutamento de macrófagos e outras células do sistema imune. O papel destas células em numerosas doenças intestinais como colite ulcerativa e doença de Crohn tem sido muito discutido, já que os dados apresentados na literatura oferecem resultados contraditórios (Yamada, Zimmerman et al. 1991; Kuhl, Kakirman et al. 2007; Zhang, Ito et al. 2011).

Já está bem estabelecido que a principal função do neutrófilo no intestino é eliminar as bactérias luminais que translocam através do epitélio e invadem a mucosa intestinal. Em um estado de quebra da barreira intestinal como é observado em pacientes com obesidade, os neutrófilos parecem ser insuficientes para controlar a multiplicação e propagação das bactérias, o que leva a translocação destes microrganismos para a corrente sanguínea, promovendo a resistência à insulina e DM2 (Li, Karlin et al. 2004). Os neutrófilos também são capazes de produzir uma grande variedade de quimiocinas e citocinas como CXCL-8, IL-10 e IL-17 que ajudam no recrutamento e ativação de células do sistema imune (Raab, Gerdin et al. 1993; Ferretti, Bonneau et al. 2003). Além disso, foi descrito recentemente que os neutrófilos estimulados com IL-23 e TNF-α são capazes de produzir IL-22, a qual é uma citocina que estimula a produção de peptídeos antimicrobianos pela células

epiteliais e auxilia no reparo do epitélio intestinal (Denning and Parkos 2013). Enfim, estes dados mostraram que a interação de diferentes células do sistema imune na LP influencia na imunidade intestinal, com o intuito de manter a integridade da barreira intestinal e impedir a translocação bacteriana.

1.5 Diferenciação e ativação das células Th17 intestinais.

As células Th17 intestinais são diferenciadas na presença das citocinas IL-6, IL-1β, TGF-β e requerem para sua manutenção a presença da citocina IL-23 (Atarashi, Tanoue et al. 2010). Após sua diferenciação, são caracterizadas por uma alta expressão dos fatores de transcrição ROR-α e ROR-γt e produzem citocinas como IL-17A, IL-17F e IL-22. Além disso, também apresentam expressão do receptor da citocina IL-23 (IL-23R) e do receptor de quimiocina CCR6, que promove a migração dessas células para o epitélio intestinal (Schutyser, Struyf et al. 2003; O'Connor, Zenewicz et al. 2010).

Desde a sua caracterização, as Th17 têm sido descritas como uma sub-população celular importante nas respostas imunes frente à patógenos extracelulares, já que induzem o recrutamento de neutrófilos e promovem a liberação de fatores antimicrobianos (Aujla, Dubin et al. 2007). As citocinas IL-17A e IL-17F sinalizam através de um complexo de proteínas formadas pelas subunidades dos receptores IL-17RA e IL-17RC e desencadeiam uma série de cascatas de sinalização como a via de NF-kB, MAPK e C/EBPs, relacionadas com a transcrição de genes que codificam as citocinas IL-6 e IL-1β nas células epiteliais intestinais. Em paralelo, estas vias estão envolvidas na manutenção da integridade do RNA mensageiro (mRNA) que codifica numerosas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, através da inativação de proteínas desestabilizadoras do mRNA como a tristetraprolina (Liu, Ren et al. 2015).

Embora o fenótipo e a função desta sub-população celular tenham sido extensivamente estudados no contexto de doenças autoimunes e inflamatórias, seu exato papel na obesidade e no DM2 permanece obscuro. Dados prévios relataram que a IL-17 é capaz de inibir a adipogênese por suprimir a expressão de fatores de transcrição pró-adipogênicos, adipocinas e móleculas relacionadas com o

metabolismo dos lipídeos e da glicose. A IL-17 também atua sobre os adipócitos já diferenciados, ao prejudicar a captação de glicose por estas células. Sendo assim, animais deficientes desta citocina apresentam uma maior tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. Em conjunto, a IL-17 atua como um regulador negativo da diferenciação de adipócitos e do metabolismo glicêmico nessas células. Entretanto, essa citocina também atrasa o desenvolvimento de obesidade induzida com dieta hiperlípidica, inferindo um possível papel protetor da IL-17 (Ahmed and Gaffen 2010; Zuniga, Shen et al. 2010).

1.6 Importância das células Th17 na mucosa intestinal.

O papel das células Th17 no intestino está relacionado à manutenção da homeostase intestinal. Neste local, a produção de citocinas pró-inflamatórias decorrente de sinais derivados da ativação de receptores do tipo *Toll* em determinadas sub-populações de DCs parece ser importante na diferenciação das células Th17 intestinais (Atarashi, Tanoue et al. 2010). As células Th17 diferenciadas desempenham diversas funções importantes no intestino tais como a manutenção da integridade da barreira intestinal e o controle do balanço das populações de bactérias presentes na microbiota intestinal. Neste sentido, foi observado que camundongos deficientes do receptor de IL-17 (IL-17RA$^{-/-}$) apresentam quantidades normais de neutrófilos circulantes no sangue, porém esse número está comprometido no intestino, resultando em disbiose intestinal, translocação bacteriana e maior intolerância à glicose. Este efeito observado das células Th17 é mediado pela expressão do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-SCF) e da citocina IL-6.

Além das células Th17 regularem positivamente a granulopoiese, elas também induzem o recrutamento de neutrófilos do sangue para LP intestinal, já que promovem a expressão de quimiocinas como CXCL-1 e CXCL-2 pelas células epiteliais e fibroblastos da mucosa intestinal (Aujla, Dubin et al. 2007). Por outro lado, as células Th17 estão envolvidas diretamente com a regulação de componentes da barreira física intestinal por reforçar as TJ e promover uma maior associação das proteínas claudina 1 e 2 na membrana das células epiteliais

(Kinugasa, Sakaguchi et al. 2000). As células Th17 também induzem a expressão de genes de mucinas por células caliciformes presentes no intestino, as quais são proteínas glicosiladas que formam parte da camada de muco que recobre as células epiteliais (Chen, Thai et al. 2003). Adicionalmente, foi verificada a correlação da produção de IL-17 com o aumento da expressão de β-defensinas no cólon, assim como a capacidade desta citocina em promover a expressão do receptor polimérico de Ig e a liberação de IgA pelas células B presentes no intestino (Ishigame, Kakuta et al. 2009; Cao, Yao et al. 2012).

Dados mais recentes estabelecem uma possível relação entre as células Th17 e a obesidade. Em um estudo, foi observado que camundongos submetidos a uma dieta rica em gorduras apresentaram redução do número de células ROR-γt $CD4^+$ produtoras de IL-17 na LP intestinal, e este fato foi associado com um processo de disbiose intestinal e maior translocação bacteriana. Como decorrência do reduzido número de células Th17 na LP, esses animais desenvolveram espontaneamente resistência à insulina e intolerância à glicose (Burcelin and Pomie 2016). Em síntese, essas evidências mostraram o papel fundamental das células Th17 na manutenção da imunidade intestinal, e sua potencial implicação no controle da obesidade e resistência à insulina. Porém, até o momento não há relatos sobre o seu envolvimento na modulação da resposta inflamatória intestinal e disfunção metabólica, que resultam no desenvolvimento do DM2.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1 Geral.

Investigar o papel do eixo IL-17/IL-17RA no controle das alterações metabólicas e inflamatórias do DM2 induzido por dieta hiperlipídica, assim como avaliar a interferência da microbiota intestinal neste processo.

2.2 Específicos.

Em um modelo de DM2 induzido por dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes do receptor IL-17RA, tivemos como objetivos específicos:

1) Avaliar a cinética de expressão gênica e protéica das citocinas IL-6, IL-17 e IL-22 no intestino (íleo) durante o desenvolvimento do DM2;
2) Identificar as populações celulares responsáveis pela produção da citocina IL-17 nos linfonodos mesentéricos e lâmina própria de camundongos diabéticos;
3) Elucidar os mecanismos associados a resistência à insulina e disfunção metabólica e inflamatória (local e sistêmica) no DM2;
4) Detectar possíveis alterações da permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e endotoxemia metabólica no DM2;
5) Caracterizar o infiltrado inflamatório (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e a produção de quimiocinas no intestino durante o DM2;
6) Determinar o perfil de bactérias da microbiota intestinal através da análise metagenômica do gene 16S.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Animais.

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens e IL-17RA KO machos entre 4 a 6 semanas de idade, obtidos à partir do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP em estantes micro-isoladoras com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, providas de ar filtrado, com livre acesso à água e ração, previamente esterilizados. Todos os experimentos foram desenvolvidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo para uso de animais em experimentação n° 144/2014.

3.2 Indução de diabetes do tipo 2 (DM2).

Foi utilizado o modelo experimental de resistência insulínica à DM2 induzido por dieta hiperlipídica. Após período de adaptação de 7 dias, os animais selvagens e deficientes foram divididos em 4 grupos de experimentação. Tanto animais deficientes quanto selvagens receberam uma dieta controle (AIN93-composta por 10% de gordura, 70% de carboidrato e 20% de proteína) ou uma dieta hiperlipídica (D12492- composta por 60% de gordura, 20% de carboidrato e 20% de proteína). Os animais foram alimentados durante 9 semanas com as dietas acima mencionadas.

3.3 Perfil nutricional.

O perfil nutricional foi determinado pela análise de ingestão alimentar, calórica e monitoramento do peso corporal. Todos os animais receberam 4g de ração diariamente e, após 48 horas, a quantidade não ingerida foi mensurada e a quantidade ingerida foi definida como ingestão alimentar (IA). A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor

energético de cada ração (Kcal/g). O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente, utilizando-se uma balança digital.

3.4 Testes da tolerância à glicose (GTT) e insulina (ITT).

Os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas. As coletas sangüíneas foram realizadas na condição basal e após administração intraperitoneal de uma solução de glicose a 25% (Sigma®-Aldrich) equivalente a 2,0 g/kg peso corporal, sendo coletadas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos da administração de glicose. Os resultados foram apresentados de acordo com a variação da concentração de glicose plasmática versus o tempo plotado em gráfico, obtendo-se uma curva exponencial. A resposta da insulina foi analisada após jejum de 6 horas e os níveis de glicose no sangue foram determinados nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos da administração de insulina regular de 1,5 UI/Kg de peso corporal. Foi utilizado ACCUCHEK®Active para a leitura dos níveis de glicose em ambos testes.

3.5 Quantificação de insulina no soro.

As concentrações de insulina circulantes foram mensuradas no soro dos animais através de teste imunoenzimático da AlpcoImmunoassays (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Quantificação de colesterol e triglicerídeos no soro.

As concentrações de triglicerídeos e colesterol total foram mensuradas no soro dos animais através de testes enzimáticos da Labtest, de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 Avaliação da expressão e fosforilação da AKT e PI3K no músculo.

Inicialmente, foi realizada a administração de insulina por via intraperitoneal (3,8 UI/Kg de peso corporal) e, após 3-5 minutos foi coletado o músculo esquelético. Os fragmentos foram homogeneizados com um polytron em tampão de extração (Tris 0,05 mol/L, cloreto de sódio (NaCl) 0,150 mol/L, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,001 mol/L, Triton X-100 1%, Deoxicolato 1%, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1 %, ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) 0,001 mol/L - 1:100, fluoreto de sódio (NaF) 0,01 mol/L - 1:100 e inibidor de proteases). Um total de 60 µg de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após bloqueio dos sítios inespecíficos com leite 5%, as membranas foram incubadas com anticorpo primário por 20 horas a 4ºC. Os anticorpos utilizados foram para β-actina, pSer473-AKT, AKT total, pTyr467-PI3K e PI3K total na diluição 1:500 (CellSignaling). Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos, com TBS-T (100 mL de TBS 10X; 1 mL de Tween 20 e água destilada q.s.p. 1 L) e incubadas com o anticorpo secundário IgG marcado com peroxidase na diluição 1:1000 (GE Healthcare) durante 1 hora, sob agitação. Por fim, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T e a detecção foi realizada com kit de quimioluminescência (PIERCE). A intensidade das bandas foi avaliada por análise densitométrica utilizando-se o software ImageJ.

3.8 Extração de células da lâmina própria e células endoteliais intestinais.

As células da lâmina própria (LP) e células endoteliais (CE) foram extraídas à partir da digestão do intestino delgado coletado de camundongos submetidos a uma dieta controle ou uma dieta rica em lipídeos. Inicialmente, foram removidas as placas de Peyer intestinais e as fezes. Posteriormente, os intestinos foram fragmentados em segmentos de 2 centímetros e incubados sob agitação, a temperatura de 37ºC em 20mL de meio RPMI, 3% soro fetal bovino (SFB), 5mM EDTA e 0,145 mg/mL de ditiotreitol (DTT). Após incubação, os fragmentos foram agitados em meio RPMI

incompleto (2mM EDTA) e passados em peneira de metal por 3 vezes, conservando-se em ambos casos o meio para coleta das células epiteliais. Em seguida, os segmentos foram fragmentados e transferidos para 3mL de meio RPMI incompleto contendo 0,05% de DNAse, 0,2 mg/mL de liberase TL (Roche) e incubados sob agitação, a temperatura de 37ºC por 30 minutos. Na sequência, foi adicionado 20 mL de meio RPMI completo com 3% SFB para inibir a atividade das enzimas de digestão. O material foi transferido para peneiras de 70µm e macerado. Após centrifugação (1500 rpm, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante foi descartado e adicionado 10 mL de meio RPMI completo com 3% SFB, sendo o material transferido e filtrado em peneiras de 40µm e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1mL de meio RPMI completo com 5% SFB foram contadas em câmara de Neubauer. O meio coletado para isolamento das células epiteliais foi centrifugado (1500 rpm, 10 minutos, 4ºC) e as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI completo com 5% SFB para sua posterior contagem.

3.9 Análise de leucócitos por citometria de fluxo.

A análise quantitativa e fenotípica de células extraídas dos linfonodos mesentéricos (LMN) e da lâmina própria (LP) foi realizada por citometria de fluxo (FACS). A detecção de linfócitos Th17 ($CD3^+CD4^+IL\text{-}17^+$) e γδ ($CD3^+CD4^-\gamma\delta^+IL\text{-}17^+$) foi determinada após cultura dos leucócitos, *in vitro*, com forbol-miristato-acetato (PMA) e ionomicina, e, subsequentemente, brefeldina. Além disso, a quantificação de macrófagos ($CD11b^+CX3CR1^+$), neutrófilos ($CD11b^+Ly6G^+$) e células dendríticas ($CD11b^+CD103^+$) também foi avaliada nos linfonodos mesentéricos (LMN) e na lâmina própria intestinal (LP). As células foram lavadas e ressuspensas em Fcblock (para bloquear ligações inespecíficas) por 30 minutos à 4ºC e, em seguida, incubadas com 1,5µg de anticorpos monoclonais específicos aos marcadores determinados acima, conjugados com FITC, PE, PerCP, APC ou APC-Cy7 por 30 minutos à 4ºC. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e centrifugadas à 250 x g por 10 minutos. Os leucócitos foram

adquiridos em FACSCanto II (Becton&Dickson®) e as análises foram feitos usando o software FlowJo (Tree Star).

3.10 Estimulação de células da lâmina própria e células endoteliais intestinais com IL-17 recombinante.

Um total de $1x10^6$ células epiteliais e $0,5x10^6$ células da LP isoladas de camundongos submetidos à dieta controle ou dieta rica em lipídeos foram plaqueadas em placas de 48 poços e estimuladas com meio de cultura, 10 ng/mL ou 100 ng/mL de IL-17 recombinante. Após 24 horas de estímulo, foi coletado o sobrenadante da cultura para seu uso posterior em ensaios de ELISA. As células da cultura foram centrifugadas (8000 rpm, 2min, 4ºC), ressuspendidas em uma solução de RNA later e conservadas a -20ºC, para posterior extração do RNA.

3.11 Extração de RNA.

A extração do RNA total das amostras de intestino e da cultura celular foi realizada utilizando-se um kit de extração de RNA (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de nuclease, sendo então armazenadas a –70ºC. A concentração de RNA foi determinada utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000 (ThermoTechnologies).

3.12 Reações de PCR em tempo real.

A expressão quantitativa dos genes das citocinas IL-6, IL-17A, IL-22, as quimiocinas CXCL1 e CXCL2, o gene do receptor de IL-17, as proteínas de junção ocludina e claudina-2, assim como as mucinas 1 e 2 foram analisadas através de reações de PCR em tempo real no íleo e em células da cultura celular, utilizando-se os sistemas SYBR Green em um aparelho GeneAmp 7700 (AppliedBiosystems). O sistema SYBR Green realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (ABI Prism Software) através de nucleases fluorogênicas utilizadas na

reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado à partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagente SYBR Green, como determinado pelo fabricante. A reação básica de amplificação compreendeu 10 minutos à 95ºC, e quarenta ciclos de 15 segundos à 95ºC e 1 minuto à 60ºC, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 à 95ºC, que foi empregada para a obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

3.13 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.

A detecção de citocinas (IL-17A, IL-6 e IL-22) e quimiocinas (CXCL1 e CXCL2) foi realizada pelo método de ELISA. A quantificação foi realizada no homogenato dos tecidos em solução contendo inibidores de protease e no sobrenadante obtido da cultura das células epiteliais e da LP intestinal após estímulo com IL-17 recombinante. Foram utilizados kits específicos para tais dosagens, de acordo com as especificações do fabricante (R&D System).

3.14 Estudos da permeabilidade intestinal pela análise de FITC-Dextran.

Os camundongos, após 12 horas de jejum, receberam fluoresceína isotiocianato (FITC)-Dextran por gavagem (200 mg/kg de peso corporal) (Sigma-Aldrich). O FITC-Dextran é uma macromolécula não metabolizada que pode ser utilizada como uma sonda de permeabilidade. Após 4 horas da administração do FITC-Dextran, o sangue total foi coletado da ponta da veia da cauda. O sangue foi centrifugado à 2000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente. O soro foi coletado e diluições de FITC-Dextran em PBS foram usadas como curva padrão. A absorção de 100µL de soro ou de padrão foi medida em fluorímetro com excitação de 485 nm e a leitura em 535 nm.

3.15 Avaliação da translocação bacteriana por contagem das unidades formadoras de colônias.

Para avaliação das bactérias presentes no sangue foi coletado o soro desses animais em condições estéreis. Posteriormente, alíquotas de sangue de 50µL foram semeadas com alça estéril em placas de cultura bacteriana contendo meio *Brain Heart Infusion Agar* (BHI) e acondicionadas em estufa a 37ºC por 48 horas para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

3.16 Dosagem de LPS no soro.

A concentração de LPS no soro foi determinada usando um kit baseado em um extrato de amebócitos de Limulus (Kit de LAL, terminal-QCL1000; LONZA).

3.17 Análise metagenômica (seqüenciamento).

O conteúdo fecal foi extraído do cólon dos animais e imediatamente armazenado a -20ºC. O DNA genômico foi isolado através da utilização de um kit de extração de DNA de fezes (DNAQIAmp QIAGEN) e quantificado. As bibliotecas foram sintetizadas a partir de 500ng de DNA total seguindo as instruções da Rapid Library Preparation Kit (Roche Applied Science). Estas bibliotecas foram analisadas no Bioanalyzer com um Kit de DNA de alta sensibilidade (Agilent Technologies), e grupos equimolares foram feitos, titulados, e submetidos a um grande volume de PCR, seguindo as instruções do fabricante (Roche Applied Science). Posteriormente, as amostras foram seqüenciadas no aparelho IlluminamiSeq usando *primers* específicos para a região V4 do gene 16S bacteriano conforme descrito por Palm e colaboradores (Palm, de Zoete et al. 2014). A abundância relativa foi obtida usando o programa QIIME (Caporaso, Kuczynski et al. 2010).

3.18 Análise histopatológica.

A avaliação histopatológica do fígado, pâncreas e intestino foi realizada após coloração com hematoxilina e eosina (HE) de amostras fixadas em PBS/formaldeído 10%.

3.19 Análises estatísticas.

Os resultados foram expressos em média ± EPM. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância de uma via (“oneway” ANOVA) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste de Tukey. Os valores foram considerados significantes quando $p<0,05$.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Cinética de expressão gênica e protéica de citocinas do perfil Th17 no íleo.

Na mucosa intestinal residem tanto populações de células do sistema imune inato e adaptativo, como macrófagos, DCs, linfócitos inatos (LTi), linfócitos Tregs e Th17. Os linfócitos Th17 são diferenciados em resposta aos componentes da microbiota intestinal e estão em maior proporção na LP do intestino delgado (Stumvoll, Goldstein et al. 2005). Além disso, foi descrito que alguns tipos de bactérias, como as SFB, são capazes de promover seletivamente a diferenciação desses subtipos celulares (Shulman 2000; Khodabandehloo, Gorgani-Firuzjaee et al. 2016). Essa diferenciação é dependente da produção de citocinas tais como IL-6, IL-23 e TGF-β por DCs presentes na LP. Após sua ativação, os linfócitos Th17 sintetizam as citocinas IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (Shulman 2000), sendo esta última citocina capaz de induzir a produção de peptídeos antimicrobianos por células epiteliais e a secreção de muco por células caliciformes do intestino (Frazier, DiBaise et al. 2011). Inicialmente, avaliamos o perfil de expressão gênica e protéica da citocina IL-6, indutora do padrão Th17, assim como daquelas produzidas por esse subtipo celular (IL-17A e IL-22), no íleo de camundongos selvagens (WT) após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Foi verificado o aumento significativo tanto da expressão gênica como protéica de IL-6, IL-17A e IL-22 no íleo dos animais após 9 semanas de DH quando comparados aqueles com DN **(Figuras 1 A-C)**. Em conjunto, esses resultados indicam a regulação positiva de citocinas do padrão de resposta Th17 no intestino de animais submetidos a uma dieta DH.

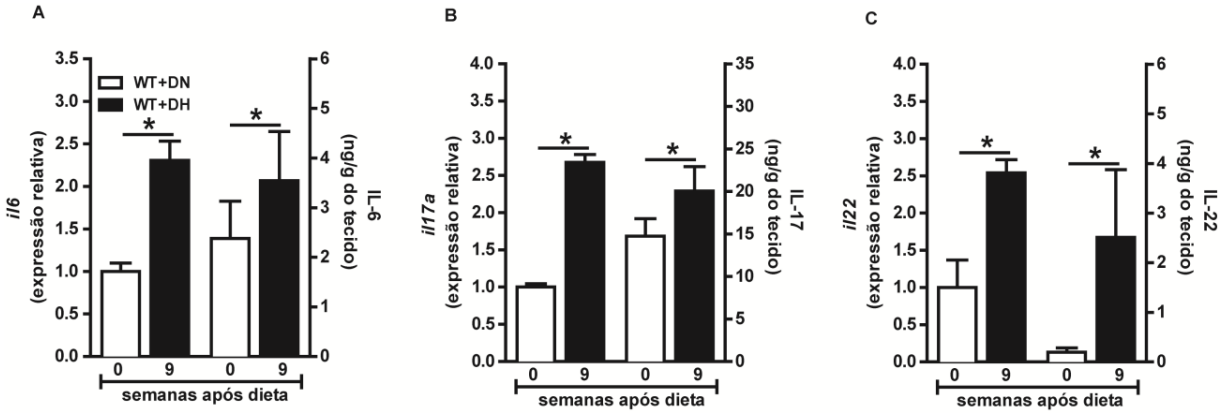

Figura 1: Expressão gênica e protéica das citocinas IL-6, IL-17A e IL-22 no íleo de animais WT após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Expressão gênica relativa e protéica de IL-6 (A), IL-17A (B), e IL-22 (C) no íleo por RT-PCR ou método imunoenzimático (ELISA), respectivamente. Os valores são expressos como a média±desvio padrão. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com animais WT após DN; N=5 animais por grupo. Para comparar os grupos de animais foi usado o teste t de Student não paramêtrico.

4.2 Caracterização das populações celulares produtoras de IL-17 nos LMN e LP intestinal.

Tendo em vista que a DH aumenta a expressão de citocinas do perfil Th17 no íleo, nosso próximo passo foi identificar os subtipos celulares produtores de IL-17 na LP intestinal e nos linfonodos mesentéricos (LMN) de camundongos WT submetidos à DN ou DH. Para isso, foram avaliadas duas populações celulares: células $CD3^{+}CD4^{+}IL\text{-}17A^{+}$ (Th17) e $CD3^{+}\gamma\delta^{+}IL\text{-}17A^{+}$ (linfócitos Tγδ) **(Figuras 2 A-G)**. Não observarmos diferenças estatísticas tanto na porcentagem como no número absoluto dessas populações analisadas nos LMN **(Figuras 2 A-C)**. Apesar de não haver alteração da porcentagem, houve uma tendência ao aumento do número absoluto de células Th17 na LP intestinal dos animais submetidos à DH quando comparados com aqueles com DN **(Figuras 2 D-G**). Estes dados indicam o aumento da diferenciação/expansão de células Th17 na mucosa intestinal após o consumo de DH.

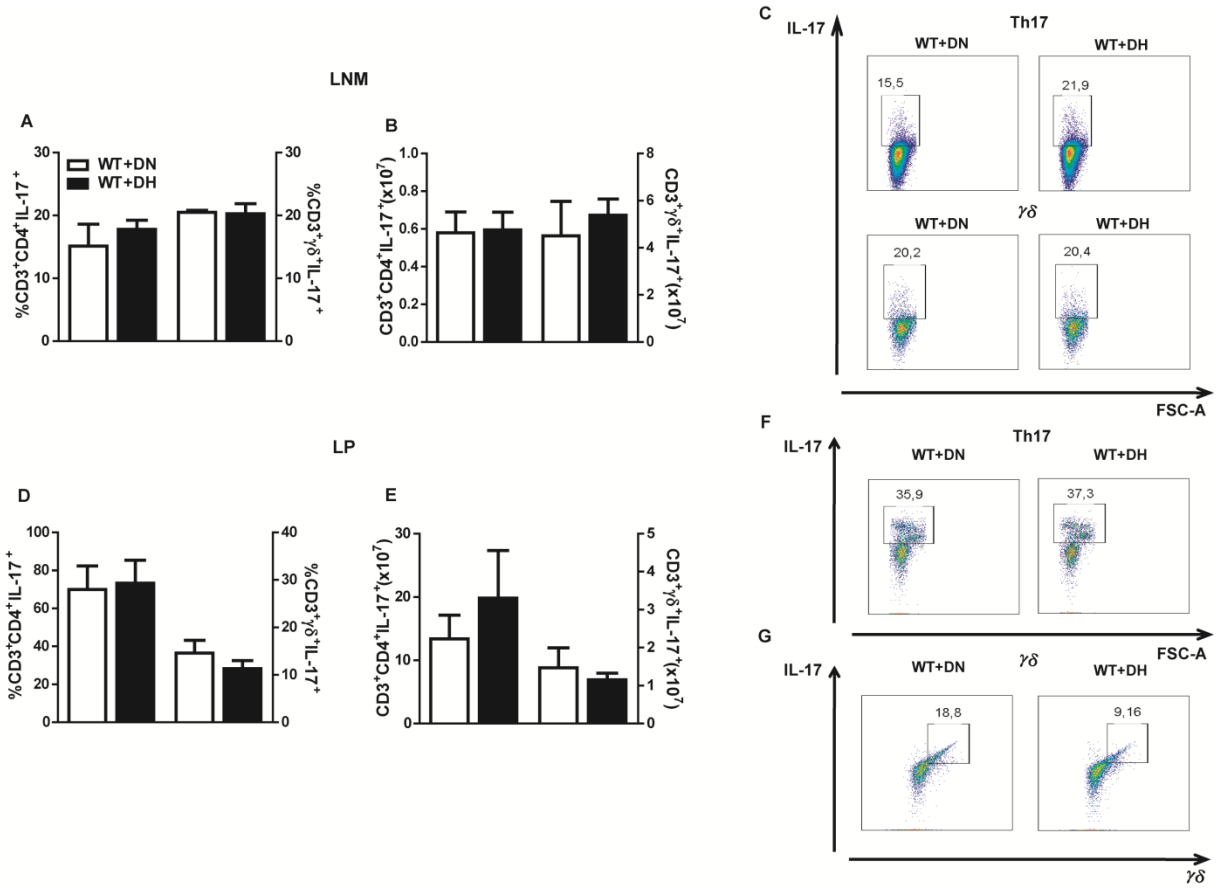

Figura 2: Identificação de células produtoras de IL-17 nos linfonodos mesentéricos (LNM) e lâmina própria (LP) de camundongos WT após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). A porcentagem e número absoluto de células Th17 e T $\gamma\delta^+$ IL-17$^+$ nos LNM (A , B e C) e na LP (D, E, F e G) foi determinada por FACS. As células foram estimuladas em cultura com PMA e ionomicina para marcação de IL-17 intracelular. Os dotplots são representativos (C, F e G) de um experimento. Os valores são expressos como a média±desvio padrão; N=5 animais por grupo. Para comparar os grupos de animais foi usado o teste t de Student não paramêtrico.

4.3 Correlação com o recrutamento de neutrófilos e macrófagos na LP intestinal.

Devido a importância da sinalização do eixo IL-17/IL-17R na produção e migração de células inflamatórias, fomos avaliar se o aumento do número de células Th17 coincide com o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para a mucosa intestinal. Sendo assim, foram avaliadas duas populações celulares: os neutrófilos ($CD11b^{+}Ly6G^{+}$) e os macrófagos anti-inflamatórios ($CD11b^{+}CX3CR1^{+}$). Embora não seja significativo, foi observado um aumento da porcentagem e do número absoluto de neutrófilos e de macrofágos na LP intestinal dos animais selvagem submetidos a DH em relação aos animais do mesmo grupo com DN **(Figuras 3 A-D).** Estes resultados mostram que o recrutamento de neutrófilos e macrófagos correlaciona com o aumento das células Th17 na LP intestinal, inferindo que o eixo IL-17/IL-17R contribui paro influxo de células inflamatórias na LP intestinal após DH.

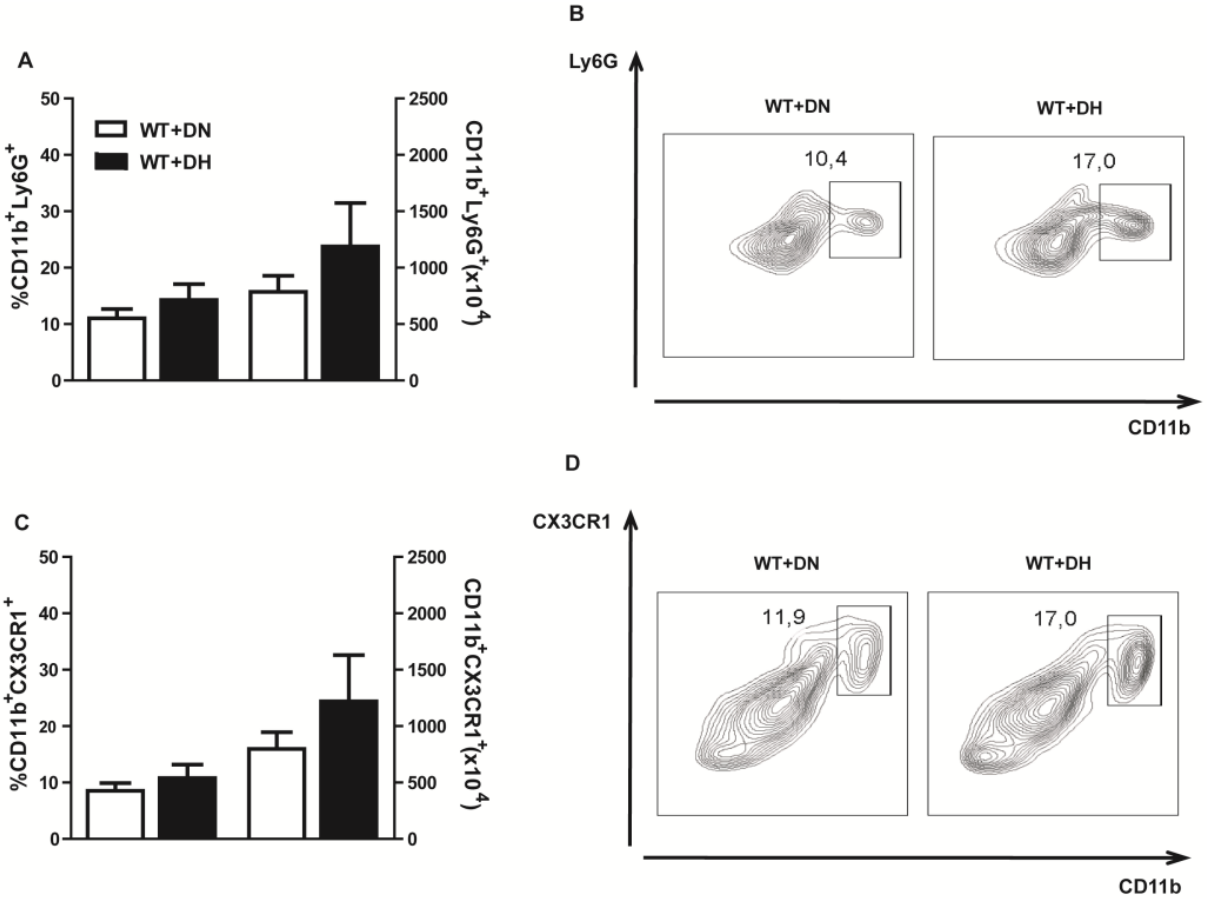

Figura 3: Porcentagem e número absoluto de células na lâmina propria (LP) de camundongos WT após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Porcentagem e número absoluto de neutrófilos ($CD11b^+Ly6G^+$) (A) e macrófagos ($CD11b^+CX3CR1^+$) (C) na LP por FACS. Os dotplots (B e D) são representativos de um experimento. Os valores são expressos como a média ± desvio padrão; N=5 animais por grupo. Para comparar os grupos de animais foi usado o teste t de Student não paramêtrico.

4.4 Contribuição da IL-17 no desenvolvimento da obesidade.

Posteriormente, fomos averiguar se a deficiência do receptor de IL-17 interfere no desenvolvimento da obesidade, já que recentemente foi descrito a sua relação com a diferenciação de adipócitos ou adipogênese (Ahmed and Gaffen 2010; Zuniga, Shen et al. 2010). Para isso, foram avaliados parâmetros nutricionais como o ganho de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão calórica. Como esperado, os camundongos WT tiveram acentuado aumento do peso corporal após 8 semanas de DH. Entretanto, os camundongos deficientes do receptor de IL-17 revelaram um aumento de peso bem inferior aos WT até 6 semanas de DH ou DN. Além disso, esses animais apresentaram perda de peso corporal a partir de 7 semanas de DH **(Figura 4 A)**. De fato, confirmamos que os camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH tiveram menor ganho do peso corporal (parâmetro determinado pela diferença entre o peso corporal inicial e final) quando comparados aos animais WT com a mesma dieta, indicando que esses animais são resistentes à indução da obesidade **(Figura 4 B)**. Ao avaliarmos a ingestão alimentar, observamos que os animais WT com DH apresentavam uma menor ingestão alimentar quando comparados com os animais do mesmo grupo submetido à DN **(Figura 4 C)**, porém não notamos alteração na ingestão calórica entre os diferentes grupos **(Figura 4 D)**. Estes dados indicam que a sinalização da IL-17/IL-17R contribui para a progressão da obesidade induzido por DH.

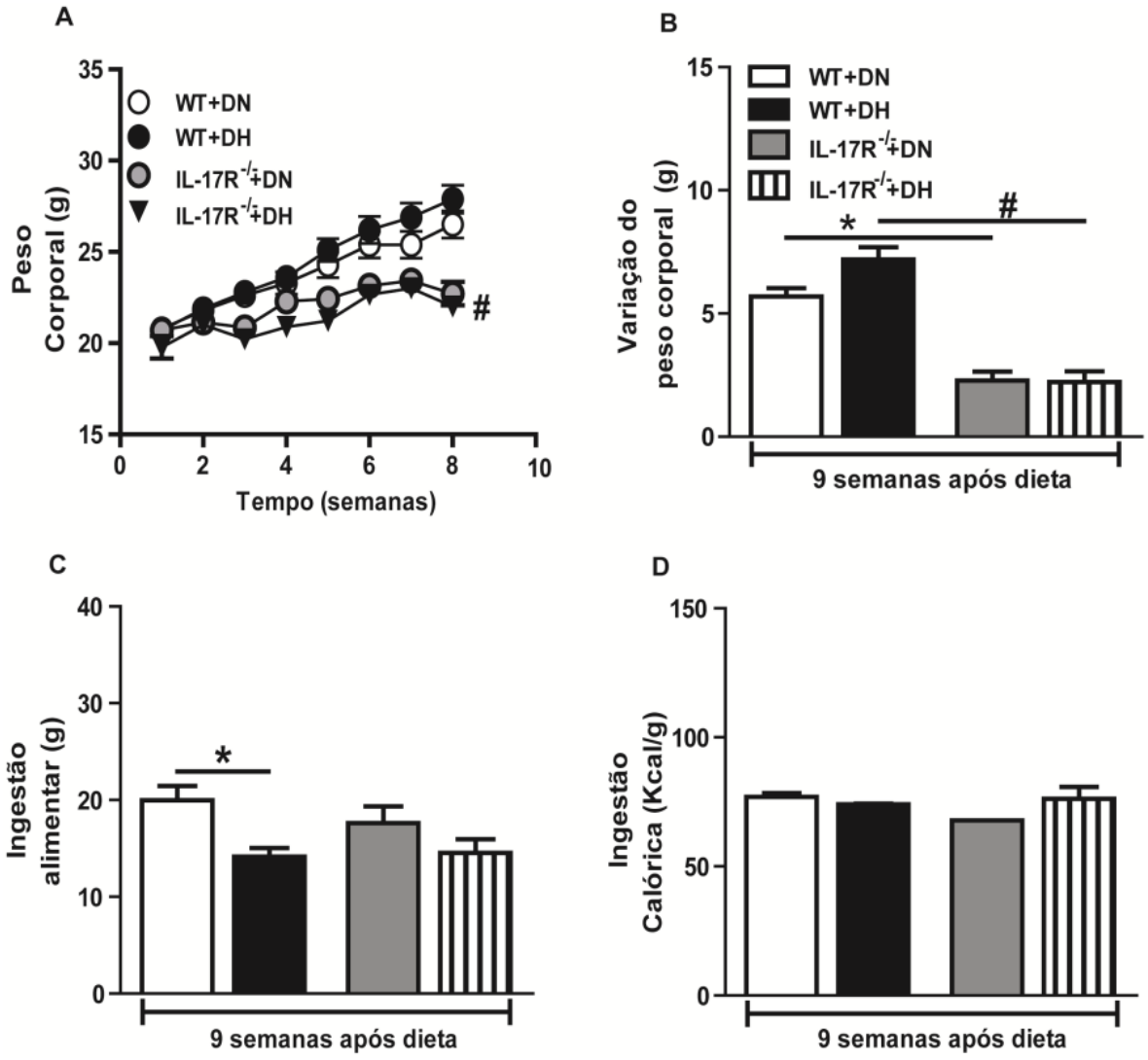

Figura 4: Parâmetros nutricionais de animais WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Monitoramento do peso corporal (A), variação do peso corporal (B), ingestão alimentar (C) e ingestão calórica (D) de camundongos WT ou deficientes do receptor de IL-17 (IL-17R$^{-/-}$). Os valores são expressos como a média±desvio padrão. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com animais WT após DN ou $^{\#}$p<0,05 quando comparados com WT com DH; N=5 animais por grupo. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância (“oneway” ANOVA)) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste não paramétrico, pós- teste de Tukey.

4.5 Efeito da IL-17 na regulação das alterações metabólicas no DM2.

Após 9 semanas de DH, também avaliamos alguns parâmetros relacionados ao metabolismo de glicose e de lipídeos. Com esse intuito, amostras de sangue foram coletadas para a realização do teste de tolerância à glicose (GTT) e determinação dos níveis de glicose sanguínea em jejum. De maneira interessante, observamos que os animais deficientes de IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH tiveram valores de glicemia aumentados quando comparados com os animais IL-17R$^{-/-}$ com DN **(Figura 5 A)**. Este dado corroborou com o teste de GTT, no qual foi visto que apresentaram uma maior intolerância à glicose quando comparados com os WT com DN ou com DH após a administração da glicose **(Figura 5 B)**. Uma observação importante é que os animais IL-17R$^{-/-}$ tiveram maiores níveis de glicemia, porém não se tornaram obesos como mostrado na figura 3A. Além disso, não verificamos diferenças significativas no teste de ITT entre os diferentes grupos. Porém, os animais IL-17R$^{-/-}$ revelaram níveis de insulina elevados no soro (principal hormônio que controla a glicemia no sangue) após DH, sugerindo um quadro de resistência à insulina nesses animais **(Figuras 5 C e D)**. Todavia, esses animais apresentaram redução significativa dos níveis de triglicerídeos e colesterol no soro quando comparados com os animais WT com DH ou IL-17R$^{-/-}$ com DN, respectivamente **(Figuras 5 E e F)**. Estes dados indicam que IL-17 controla as disfunções metabólicas (hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia), as quais estão associadas ao início do DM2.

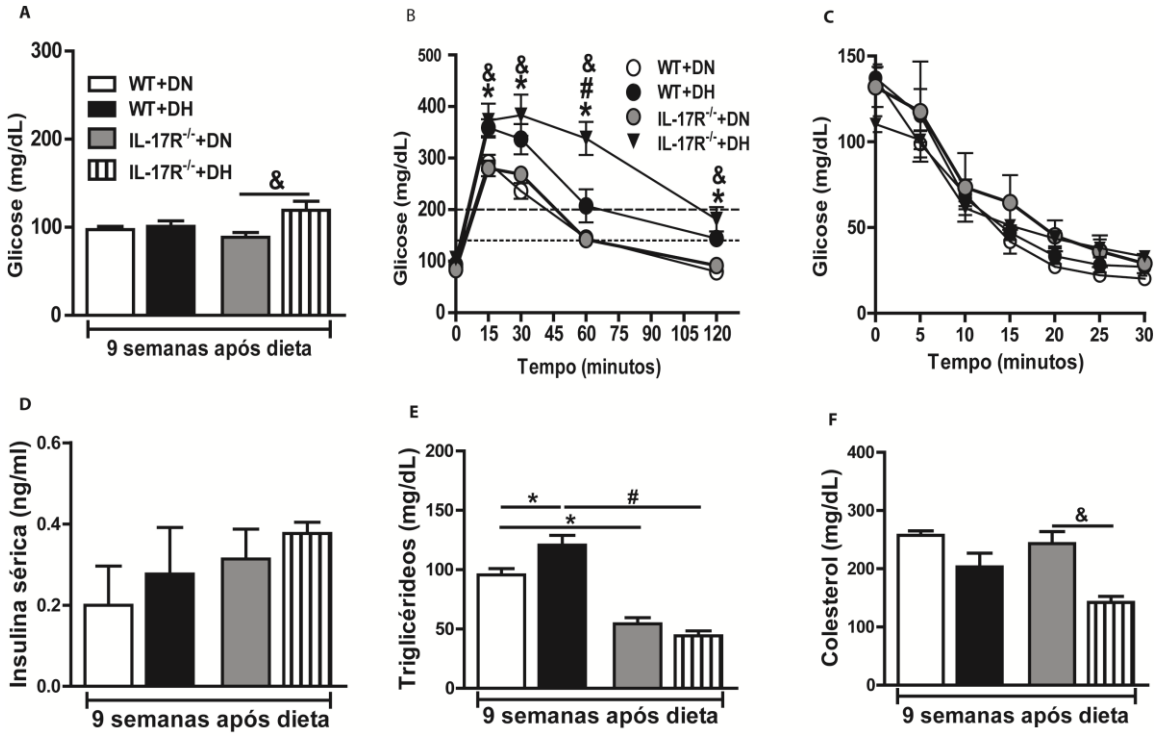

Figura 5: Parâmetros metabólicos de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Concentrações de glicose sanguínea em jejum (A), após o teste de tolerância à glicose (GTT) (B) ou teste de tolerância à insulina (ITT) (C). Concentrações de insulina (D), triglicerídeos (E) ou colesterol no soro (F). Os animais foram submetidos à 12 horas de jejum para o teste de GTT e 6 horas para o ITT. Os valores são expressos como a média±desvio padrão. *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com animais WT após DN ou $^{\#}$p<0,05 quando comparado com animais WT após DH; $^{\&}$p<0,05 quando comparados com IL- 17R$^{-/-}$ com DN; N=5 animais por grupo. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância ("oneway" ANOVA)) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste não paramétrico, pós- teste de Tukey.

4.6 Efeito da IL-17 no controle da resistência à insulina e DM2.

A insulina é o principal hormônio relacionado com a regulação dos níveis de glicose no sangue. A glicemia normal é mantida pelo equilíbrio entre a ação/secreção da insulina, portanto defeitos na sua sinalização podem resultar em um quadro de hiperglicemia crônica (Stumvoll, Goldstein et al. 2005). Na tentativa de elucidar os mecanismos intracelulares responsáveis pelos níveis aumentados de glicose, durante o jejum e após o teste de GTT, em camundongos IL-17R$^{-/-}$ com DH, avaliamos a fosforilação e a expressão total de moléculas e proteínas quinases envolvidas na via de sinalização da insulina. É sabido que a insulina se liga ao seu receptor presente na membrana de células como adipócitos, células musculares e hepatócitos e desencadeia uma cascata de fosforilação e desfosforilação que leva ativação de duas principais vias de sinalização: a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e das quinases ativadas por mitógeno (MAP quinases), resultando na regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Como resultado, a insulina controla a translocação do transportador de glicose GLUT-4 desde o citoplasma até a superfície das membranas celulares (Shulman 2000; Khodabandehloo, Gorgani-Firuzjaee et al. 2016). Sendo assim, avaliamos a fosforilação e expressão total de AKT e PI3K no músculo de camundongos WT e deficientes de IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH ou DN por *Western Blotting*. A análise por densitometria não mostrou diferenças significativas em relação à expressão de PI3K total entre os grupos de animais estudados **(Figuras 6 A e C)**. No entanto, foi observada uma relativa diminuição da fosforilação de PI3K nos animais deficientes do receptor de IL-17 submetidos à DH quando comparados com os camundongos WT submetidos à mesma dieta **(Figuras 6 A e B)**. A fosforilação de AKT foi maior nos animais WT com DH comparados com os camundongos WT com DN. Entretanto, a fosforilação de AKT mostrou-se reduzida de maneira significativa em animais IL-17R$^{-/-}$ comparados aos animais WT com DH **(Figuras 6 D e E)**. No entanto, não observamos alterações significativas da expressão de AKT total no músculo após estímulo com insulina entre os grupos estudados, com exceção dos animais IL-17R$^{-/-}$ com DN que mostraram maior expressão comparada aos WT com DN **(Figura 6 F)**.

Estes dados indicam que a deficiência do receptor de IL-17 causou um defeito na fosforilação das quinases PI3K e AKT associadas à sinalização da insulina, sugerindo maior resistência à insulina nesses animais.

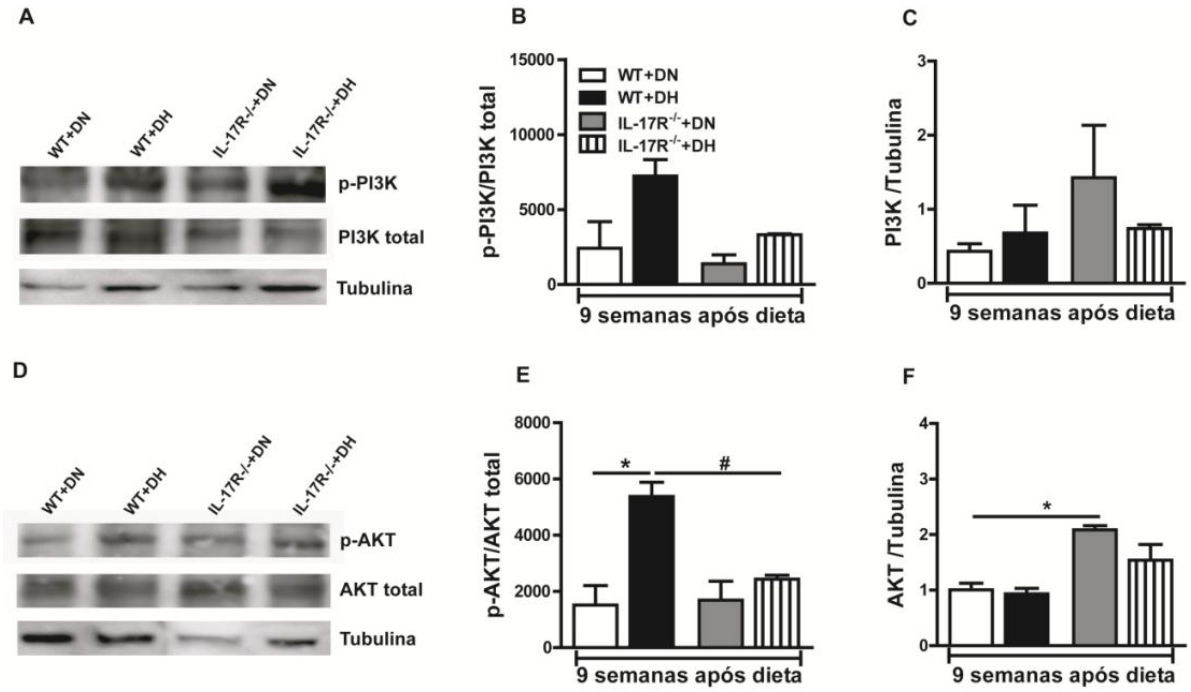

Figura 6: Expressão total e fosforilação de PI3K e AKT no músculo de camundongos WT e IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Análise representativa da fosforilação e expressão total de PI3K e AKT (A e D) e quantificação de PI3K (B e C) e AKT (E e F) por densitometria. O músculo foi coletado após 5 minutos da administração de insulina na concentração de 3,8 UI/Kg de peso corporal. Os valores são expressos como a média±desvio padrão. * $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com animais WT após DN ou $^{\#}p<0,05$ quando comparados com WT com DH; N=3 animais por grupo. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância ("oneway" ANOVA)) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste não paramétrico, pós- teste de Tukey.

4.7 Efeito da IL-17 na hiperplasia e lesão pancreática no DM2.

Posteriormente, foram analisadas alterações na morfologia das ilhotas pancreáticas, as quais estão presentes as células β produtoras de insulina. Em paralelo, foi realizada a imunohistoquimica do pâncreas endócrino para avaliar a expressão de insulina por essas células. Existem relatos que ocorre um processo inicial de proliferação/regeneração das células β produtoras de insulina como um mecanismo compensatório para normalizar os altos níveis de glicose no sangue durante o DM2 (Masjkur, Poser et al. 2016). De fato, tanto animais WT como IL-17R $^{-/-}$ submetidos à DH tiveram uma hiperplasia das ilhotas pancreáticas quando comparados com os camundongos WT com DN **(Figura 7 A)**. Além do aumento de tamanho, nossos resultados também revelaram uma maior expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas dos animais IL-17R$^{-/-}$ comparado aos WT submetidos à DH **(Figura 7 B)**. Nossos dados evidenciaram que a deficiência de IL-17 promoveu a hiperplasia das ilhotas pancreáticas a fim de compensar a resistência à insulina, e agravou o desenvolvimento do DM2.

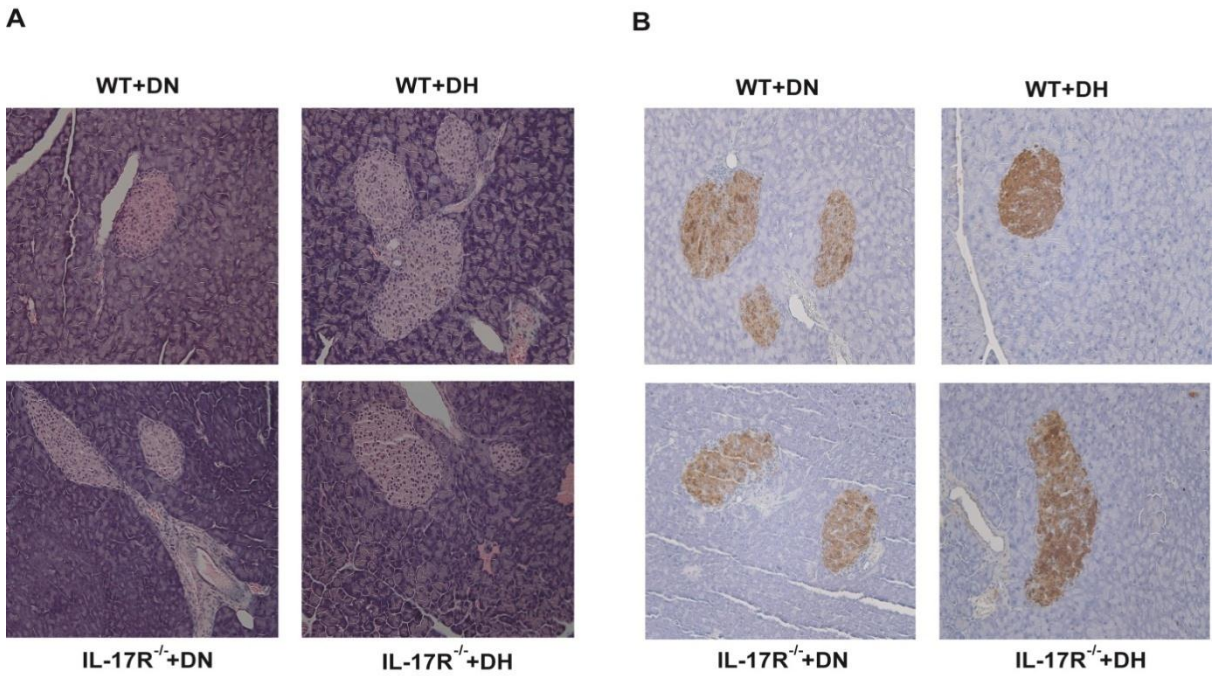

Figura 7: Cortes histológicos do pâncreas de camundongos WT ou IL-17R $^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Cortes histológicos do pâncreas foram corados com hematoxilina/eosina (HE) (A) ou imunomarcados para insulina por imunohistoquímica (B). As imagens foram adquiridas em aumento de 200X e são representativos de um animal por grupo.

4.8 Efeito da IL-17 na deposição de gordura hepática e inflamação intestinal.

Devido à diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol observados no sangue de camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH **(Figuras 5 E e F)**, também avaliamos possíveis alterações na deposição de gordura no fígado. Em paralelo, analisamos a arquitetura e presença de infiltrado inflamatório no intestino (íleo), uma vez que IL-17 interfere diretamente nos componentes físicos que compõem a barreira epitelial e influencia na formação das junções intercelulares através da indução dos genes das proteínas claudina 1 e 2, ocludina e as JAM (Frazier, DiBaise et al. 2011). De maneira surpreendente, não verificamos a presença de gordura hepática nos diferentes grupos estudados **(Figura 8 A)**. Entretanto, os resultados mostraram um intenso infiltrado inflamatório na LP intestinal associado à destruição das microvilosidades intestinais no íleo dos animais IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH em comparação aos WT com a mesma dieta **(Figura 8 B).** Em conjunto, esses dados sugerem um papel importante da IL-17 na manutenção da integridade e regulação da inflamação intestinal no DM2.

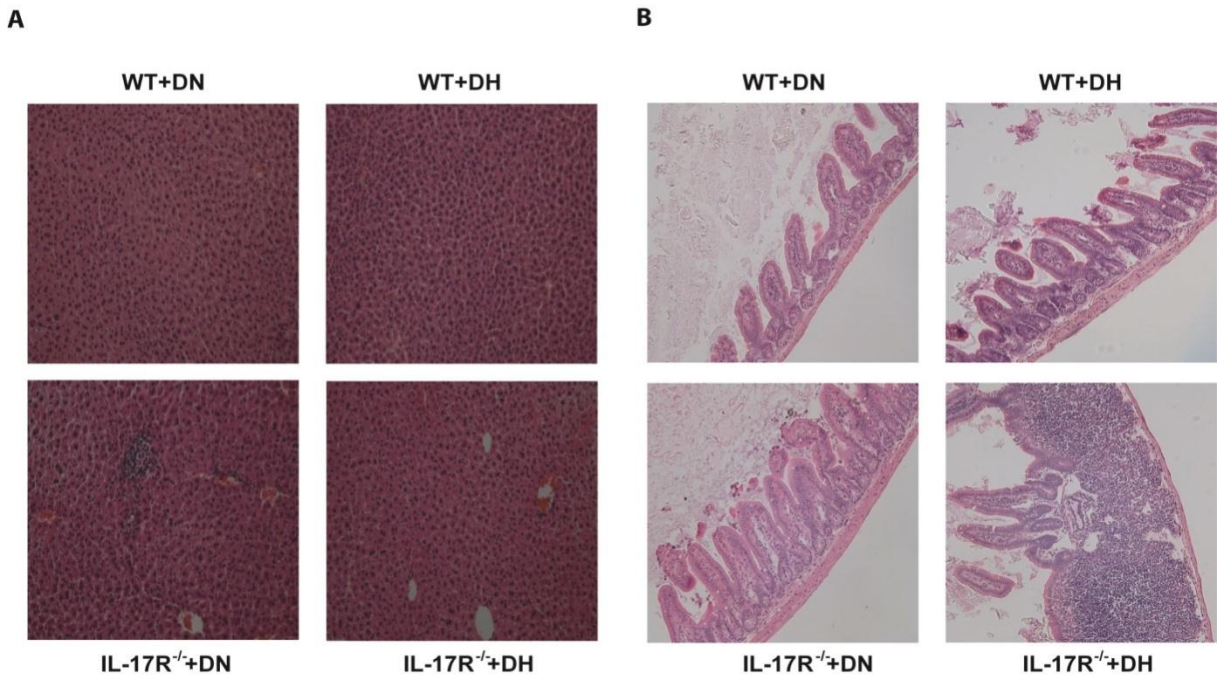

Figura 8: Cortes histológicos do fígado e intestino delgado (íleo) de camundongos WT ou IL-17R $^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Cortes histológicos do fígado (A) e do íleo (B) foram fixados e corados com hematoxilina/eosina (HE). As imagens foram adquiridas em aumento de 200X e são representativos de um animal por grupo.

4.9 Efeito da IL-17 na expressão de receptores e quimiocinas no intestino.

A citocina IL-17 induz a expressão de citocinas e moléculas importantes no recrutamento de neutrófilos desde o sangue até os tecidos inflamados, tais como: IL-6, IL-8, IL-1β, CXCL-1/KC, CXCL-2/MIP-2 e CXCR-2. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que neutrófilos são capazes de produzir esta citocina em modelos de infecções fúngicas e alérgicas (Ferretti, Bonneau et al. 2003; Hatanaka, Monteagudo et al. 2006; Taylor, Roy et al. 2014). Neste contexto, foi verificada que umas das principais causas de infecções bacterianas é a falha na migração e atividade microbicida dos neutrófilos em pacientes diabéticos (Sannomiya, Pereira et al. 1990; Hatanaka, Monteagudo et al. 2006). De fato, observamos reduzida expressão gênica do receptor de quimiocina CXCR-2 no íleo dos camundongos WT e IL-17R$^{-/-}$submetidos à DH quando comparados aos animais do mesmo grupo com DN, respectivamente **(Figuras 9 A)**. Enquanto a expressão gênica do seu ligante CXCL-1, mostrou-se aumentada de maneira significativa nos animais WT com DH, houve uma diminuição da sua expressão no íleo dos animais IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH **(Figura 9 B)**. Embora não observamos diferenças significativas, a expressão protéica das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 aumentou no íleo dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH comparados aos WT com a mesma dieta **(Figuras 9 C e D)**. Estes resultados demonstram que a citocina IL-17 influencia na expressão de quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos na mucosa intestinal no DM2.

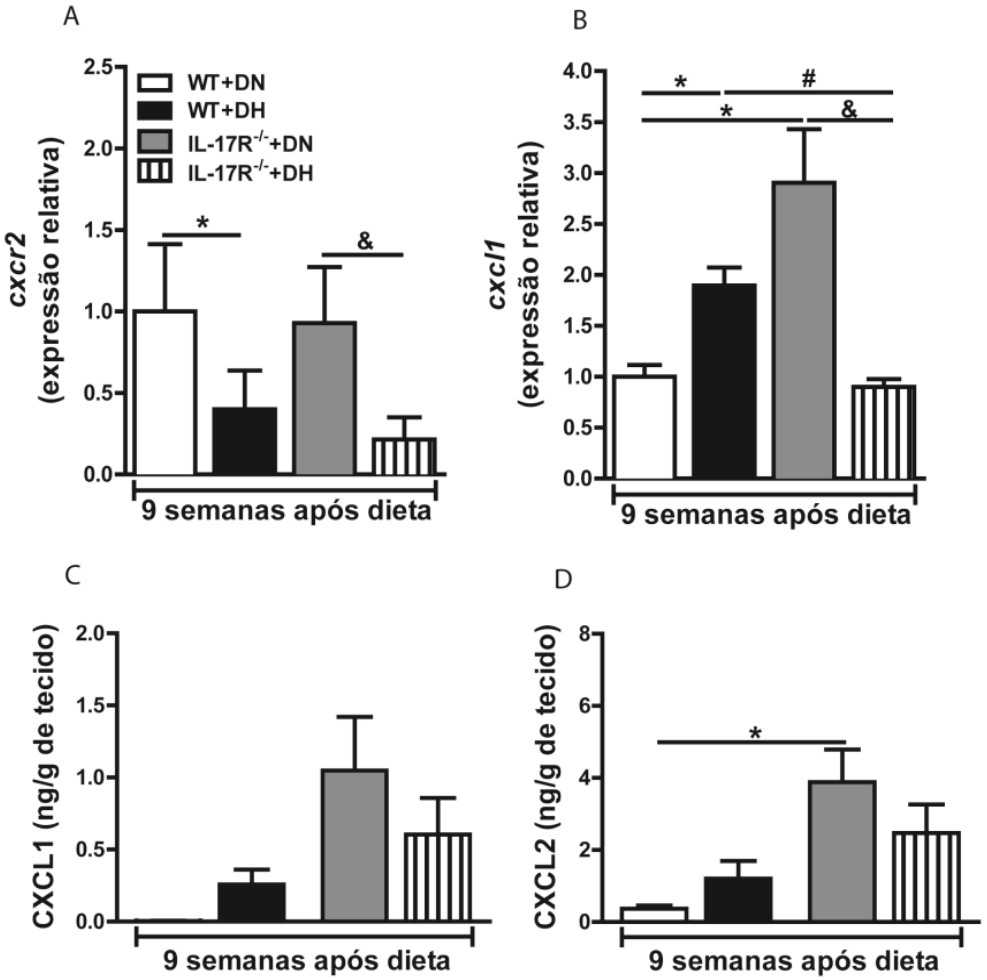

Figura 9: Expressão gênica e protéica das quimiocinas CXCL-1, CXCL-2 e do receptor CXCR-2 no íleo de camundongos WT e IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Expressão relativa de CXCR-2 (A) e CXCL-1 (B) no íleo determinado por RT-PCR. Concentrações de CXCL-1 (C) e CXCL-2 (D) foram quantificadas no íleo, pelo método imunoenzimático (ELISA). Os valores são expressos como a média ±desvio padrão; *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com animais WT após DN ou $^{\#}$p<0,05 quando comparado com animais WT após DH; $^{\&}$p<0,05 quando comparados com IL- 17R$^{-/-}$ com DN; N=5 animais por grupo. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância ("oneway" ANOVA) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste não paramétrico, pós- teste de Tukey.

4.10 Efeito da IL-17 na modulação do processo inflamatório no intestino.

Os antígenos intestinais que adentram a mucosa são capturados e transportados por células da imunidade inata até os LMNs. Além disso, alguns subtipos celulares possuem um papel importante no controle da inflamação e homeostase do intestino em doenças inflamatórias intestinais e metabólicas (Johansson-Lindbom, Svensson et al. 2005; Medina-Contreras, Geem et al. 2011; Cildir, Akincilar et al. 2013), tais como as células dendríticas ($CD11b^{-}CD103^{+}$) e os macrófagos anti-inflamatórios ($CD11b^{+}CX3CR1^{+}$). Portanto, nosso próximo passo foi avaliar a população dessas células e de neutrófilos nos LMNs por citometria de fluxo. Foi detectado o aumento tanto na porcentagem como no número absoluto de neutrófilos presentes nos LMNs de animais IL-$17R^{-/-}$ submetidos à DH quando comparados com animais do mesmo grupo com DN **(Figuras 10 A, D e G)**. As DCs $CD11b^{-}CD103^{+}$ são descritas como células residentes do intestino que têm a capacidade de capturar antígenos luminais, e migrar para os LMNs para interagir e ativar as células T. Além disso, estas células apresentam antígenos presentes na dieta, sugerindo que estas células são provenientes da LP. Este transporte de antígenos constitui um mecanismo importante na manutenção da tolerância intestinal (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009; Varol, Vallon-Eberhard et al. 2009), assim como na diferenciação de células Treg $Foxp3^{+}$ (Persson, Scott et al. 2013). Ao avaliarmos essa população celular, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem entre os grupos de camundongos estudados. No entanto, detectamos um aumento relativo no número absoluto desta sub-população no LMN dos animais WT ou IL-$17R^{-/-}$ submetidos à DH quando comparados com os mesmos respectivos camundongos submetidos à DN **(Figuras 10 B, E e H)**.

Outra população de células fundamentais para o controle da imunidade de mucosas são os macrófagos intestinais $CD11b^{+}CX3CR1^{+}$. Os macrófagos representam a maior população de fagócitos mononucleares da LP do intestino em condições normais. Esta sub-população de macrófagos residentes não apresentam a capacidade de migrar para os LMNs, pois não expressam o receptor de quimiocina CCR7, importante para a migração aos linfonodos drenantes. A principal função

descrita para estes macrófagos é a manutenção da homeostase intestinal através do reconhecimento de bactérias comensais e produção de citocinas anti-inflamatórias (Schulz, Jaensson et al. 2009; Farache, Zigmond et al. 2013). Com base nessas evidências, avaliamos esta população de macrófagos nos LMNs de camundongos WT e IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH ou DN. Nós constatamos um aumento da porcentagem dessa população celular nos LMNs de animais IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH quando comparados com os WT submetidos à mesma dieta **(Figuras 10 C e I)**. Em relação ao número absoluto, também não foi detectado um aumento entre esses grupos **(Figura 10 F)**. Esses dados evidenciam que a IL-17, de maneira direta ou indireta, reduz o aumento de neutrófilos e macrófagos anti-inflamatórios nos LMNs durante o DM2.

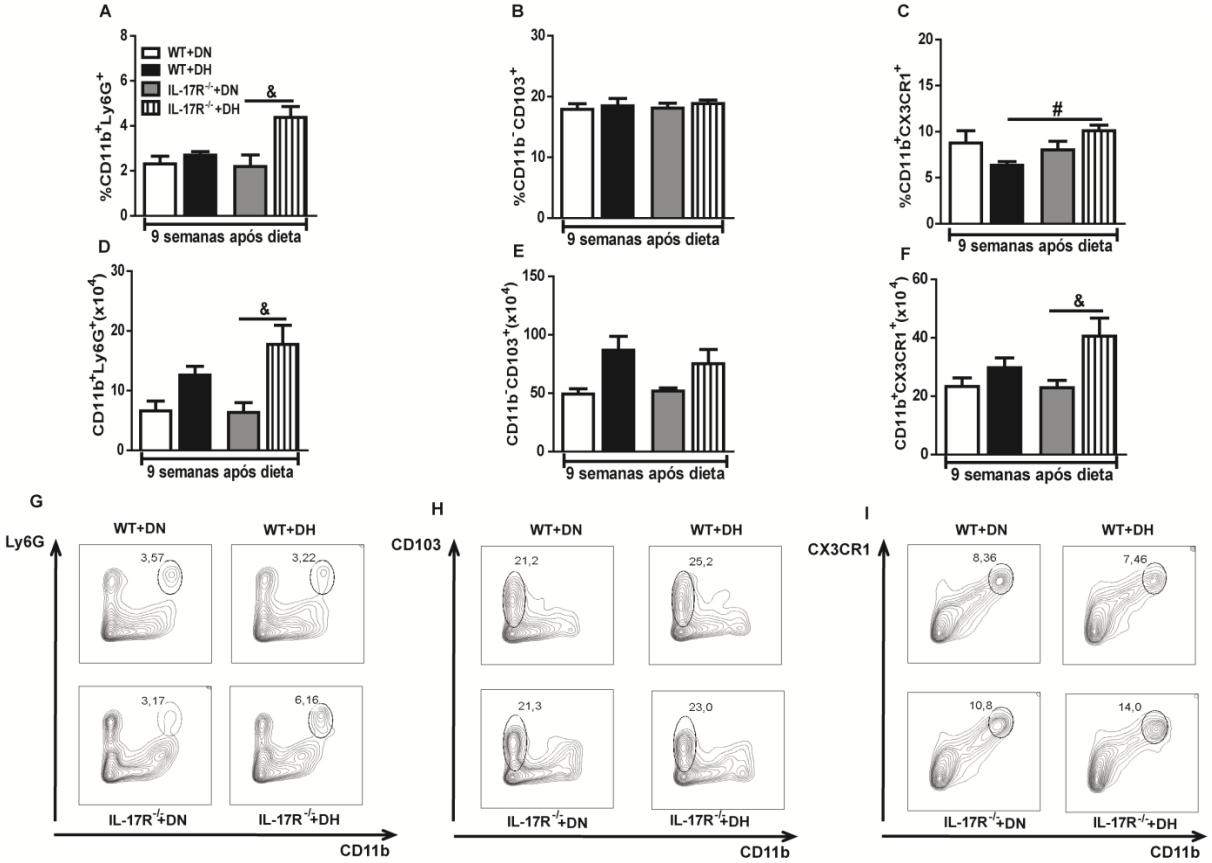

Figura 10: Porcentagem e número absoluto de células nos linfonodos mesentéricos (LMN) de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Porcentagem e número absoluto de neutrófilos (CD11b^{+} Ly6G^{+}) (A e D), células dendríticas (CD11b^{-}CD103^{+}) (B e E) e macrófagos (CD11b^{+} CX3CR1^{+}) (C e F) nos LMNs por FACS. Os dot plots (G, H e I) são representativos de um experimento. Os valores são expressos como a média±desvio padrão. $^{\#}$p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado aos animais WT após DH ou $^{\&}$p<0,05 quando comparados com IL-17R$^{-/-}$ com DN; N=3 animais por grupo. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância (“oneway” ANOVA)) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste não paramétrico, pós- teste de Tukey.

4.11 Efeito da IL-17 na permeabilidade intestinal e translocação bacteriana.

A associação entre a obesidade e aumento da permeabilidade intestinal foi recentemente sugerida (Frazier, DiBaise et al. 2011). É proposto que pacientes obesos e diabéticos apresentam uma mudança na composição da microbiota intestinal devido ao aumento na proliferação de bactérias patogênicas em detrimento daquelas benéficas, denominado de disbiose intestinal (Cani and Delzenne 2009; Tagliabue and Elli 2013). Estas alterações na microbiota podem influenciar a integridade do epitélio intestinal, ocasionar a colonização e inflamação da mucosa que, por sua vez, pode afetar as propriedades de permeabilidade intestinal. As principais conseqüências da disfunção da barreira epitelial é a entrada de toxinas e bactérias a partir do lúmen intestinal, como por exemplo o LPS das paredes das bactérias gram-negativas. Altos níveis de LPS podem levar à inflamação local severa, assim como essa endotoxina pode atingir a circulação e induzir uma inflamação sistêmica denominada de endotoxemia metabólica (Cani, Bibiloni et al. 2008). Neste sentido, foi descrito que uma dieta rica em gordura pode induzir elevados níveis de LPS circulantes, promovendo inflamação, obesidade e resistência à insulina (Cani, Amar et al. 2007; Saito, Hayashida et al. 2007).

Para análise da permeabilidade intestinal, utilizamos o ensaio de FITC-Dextran, que é uma molécula não metabolizada que pode ser detectada no sangue dos animais após 4 horas da administração por gavagem, sendo a concentração deste composto proporcional ao grau de permeabilidade. Apesar de animais WT e IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DN ou DH apresentarem aumento da permeabilidade intestinal, não encontramos diferenças significativas entre os grupos de animais estudados **(Figura 11 A)**. De acordo, camundongos deficientes para o receptor da IL-17, tanto com DN como DH, apresentaram maior contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) quando comparados com os WT submetidos à DN ou DH, respectivamente **(Figuras 11 B e C)**. Baseado nessas observações, nossa hipótese é que não é a permeabilidade ou a quantidade de bactérias que piora o DM2 em animais IL-17R$^{-/-}$ após DH, mas a translocação de bactérias do intestino para o sangue com um potencial provavelmente mais patogênico. Porém, a

detecção dos níveis de LPS circulantes mostrou uma tendência ao aumento no soro dos animais WT com DH, mas não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos de animais estudados **(Figura 11 D).**

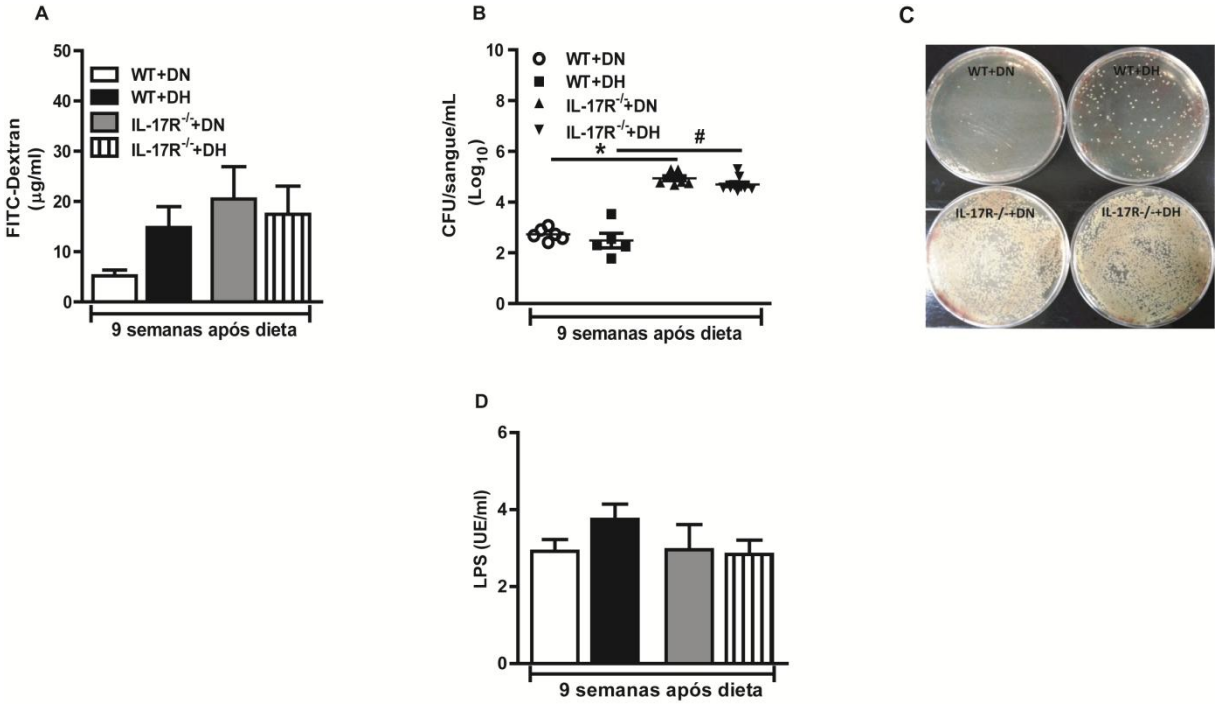

Figura 11: Análise da permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e níveis de LPS no sangue de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Ensaio de FITC-Dextran (A) , quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) (B) e níveis de LPS (D) foram realizados no soro ou sangue. Representativo do crescimento da cultura de bactérias no sangue dos animais (C). Os valores são expressos como a média±desvio padrão. *$p<0.05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com animais WT após DN ou $^{\#}p<0.05$ quando comparados com WT com DH; N=6 animais por grupo. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância ("oneway" ANOVA)) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste não paramétrico, pós- teste de Tukey.

4.12 Efeito da IL-17 na expressão de proteínas de adesão e junção celular.

As células Th17 e a citocina IL-17 tem um papel crucial na manutenção da integridade intestinal, uma vez que a citocina IL-17 induz a expressão das proteínas de junção e adesão celular como ocludina, claudina e ZO-1 presentes nas células epiteliais. Também foi documentado que IL-17 promove a expressão de genes relacionados com as mucinas em células caliciformes. As mucinas são proteínas que formam parte da camada de muco presente no epitélio intestinal, o qual favorece o isolamento das bactérias presentes no lúmen intestinal e impede a entrada de agentes patogênicos (Chen, Thai et al. 2003). Além disso, a IL-17 regula positivamente a expressão de beta-defensinas no colón, peptídeos que possuem propriedades antimicrobianas e ajudam a manter um equilíbrio entre as populações de bactérias presentes no intestino (Ishigame, Kakuta et al. 2009).

Com o intuito de investigar mais detalhadamente os parâmetros relacionados às alterações de permeabilidade e translocação bacteriana, avaliamos por qPCR a expressão gênica das proteínas de junção e adesão celular, tais com ocludina e claudina-2, assim como as mucinas 1 e 2. Os níveis elevados de claudina-2 determinam o aumento de permeabilidade intestinal, enquanto os de ocludina são inversamente proporcionais. De fato, houve aumento da expressão de claudina e redução de ocludina no íleo de animais WT submetidos à DH em relação aqueles com DN. Entretanto, verificamos diminuição significativa da expressão de claudina e aumento da ocludina no íleo dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH quando comparados com os WT com a mesma dieta, indicando uma menor permeabilidade intestinal nesses animais **(Figuras 12 A e B)**. Apesar dos resultados sugerirem que a deficiência do receptor de IL-17 reduziu a permeabilidade intestinal, acreditamos que a expressão protéica dessas moléculas esteja comprometida no íleo desses animais. Também observamos significativo aumento da expressão gênica de Muc-1, mas não de Muc-2, no íleo dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH quando comparados com os animais WT com a mesma dieta **(Figuras 12 C e D)**.

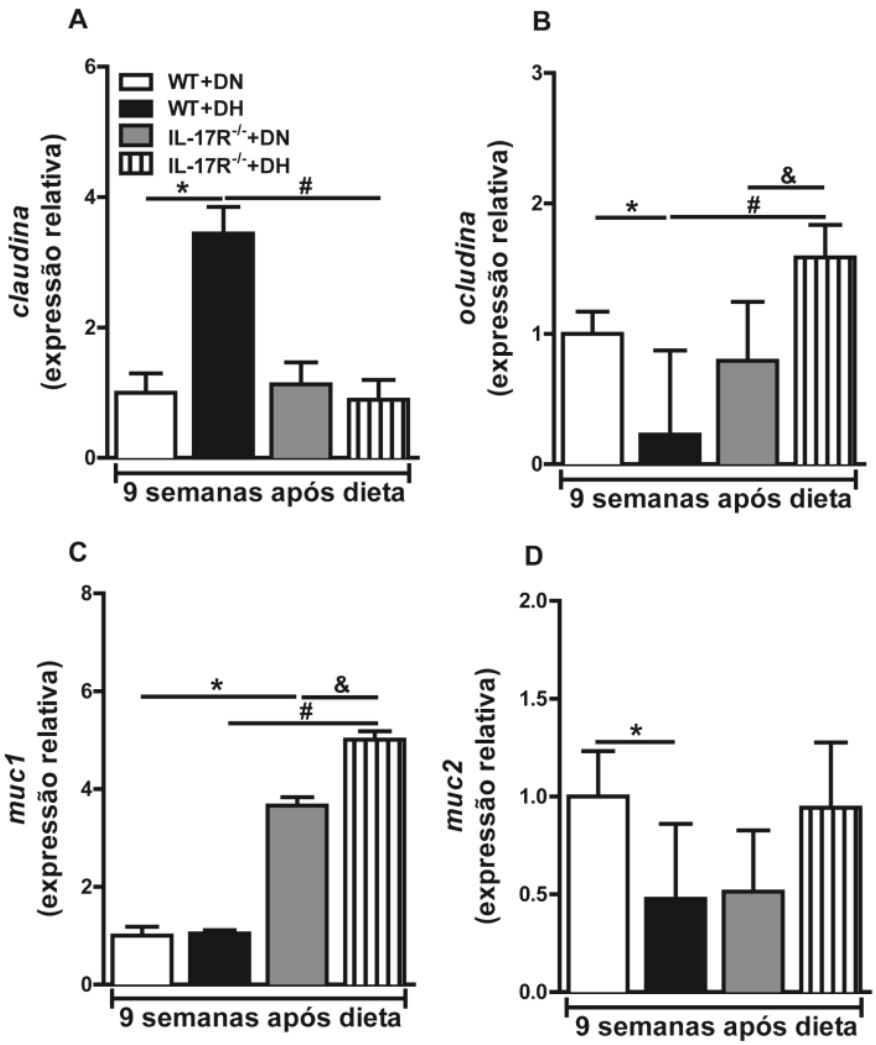

Figura 12: Expressão gênica das proteínas claudina-2, ocludina, mucina-1 e mucina-2 no íleo de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Expressão gênica relativa de claudina-2 (A), ocludina (B), Muc-1 (C) e Muc-2 (D) no íleo por RT-PCR. Os valores são expressos como a média±desvio padrão. *p<0.05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com animais WT após DN ou #p<0.05 quando comparado com animais WT após DH; $^{\&}$p<0.05 quando comparados com IL- 17R $^{-/-}$ com DN; N=5 animais por grupo. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância ("oneway" ANOVA)) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste não paramétrico, pós- teste de Tukey.

4.13 Efeito da IL-17 na composição da microbiota intestinal.

Nosso próximo objetivo foi avaliar a diversidade das bactérias presentes nas fezes (cólon) através da análise metagenômica do gene bacteriano 16S. Nesse sentido, já é bem descrito e caracterizado que em seres humanos e camundongos, o desenvolvimento de obesidade correlaciona-se com mudanças dos filos dominantes de bactérias no intestino, como *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Ley, Turnbaugh et al. 2006; Turnbaugh, Ridaura et al. 2009; Sommer and Backhed 2013). O DM2 parece estar também associado a alterações na composição da microbiota do intestino, independente do peso corporal (Li and Hotamisligil 2010). A microbiota intestinal está envolvida em numerosos processos, como por exemplo, na defesa contra patógenos invasores, imunidade das mucosas, desenvolvimento das microvilosidades intestinais e digestão de polissacarídeos não digeríveis. No entanto, o consumo de DH pode levar a um desequilíbrio destas populações de bactérias, ativando células do sistema imune e resultando no aumento de citocinas pró-inflamatórias em tecidos sensíveis à insulina como músculo, fígado e tecido adiposo. Estas citocinas, por sua vez estão envolvidas com a resistência à insulina, já que elas são capazes de promover a fosforilação do substrato do receptor da insulina (IRS) em resíduos de aminoácidos que inibem a sua sinalização.

A proliferação excessiva de bactérias gram-negativas na microbiota intestinal pode elevar os níveis do LPS circulantes. Este pode ser reconhecido pelos receptores CD14/TLR4 presentes na membrana dos macrófagos que infiltram o tecido adiposo, promovendo também um quadro de inflamação e resistência à insulina, que pode acarretar o desenvolvimento do DM2 (Li and Hotamisligil 2010). A análise metagenômica revelou a prevalência dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* em relação aos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria*, nas fezes dos camundongos deficientes do receptor de IL-17 submetidos à DH quando comparados com os WT com a mesma dieta **(Figura 13 A)**. Ao mesmo tempo, foi comprovada a redução das bactérias do filo *Verrucomicrobia* nas fezes desses animais **(Figura 13 A)**.

De maneira interessante, a análise dos gêneros de bactérias identificados nos quatro grupos de animais estudados demonstram o aumento dos gêneros

Bacteroides e *Sporosarcina* e a diminuição do gênero *Bifidobacterium* nas fezes dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH quando comparados com os WT com a mesma dieta **(Figura 13 B)**. De maneira geral, esses dados indicam que a IL-17 minimiza a disbiose e inflamação intestinal após DH, prevenindo assim a resistência à insulina e a evolução do DM2 em modelo experimental.

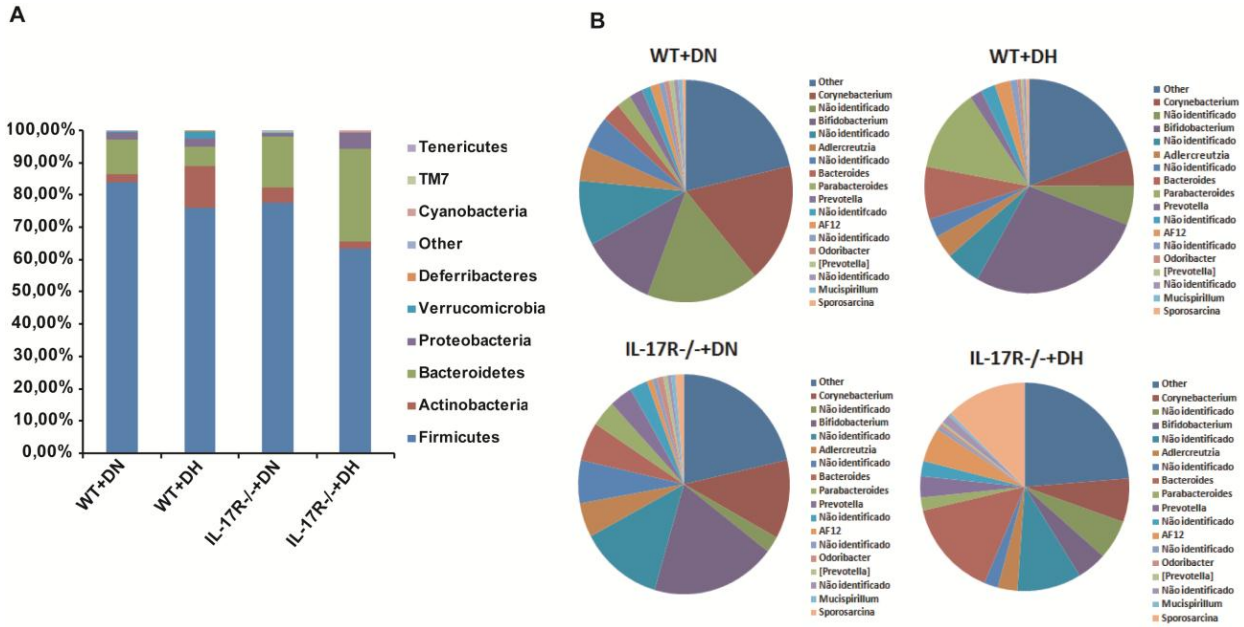

Figura 13: Abundância relativa das bactérias presentes nas fezes de camundongos WT ou IL-17R$^{-/-}$ após 9 semanas de dieta controle (DN) ou dieta hiperlipídica (DH). Representação dos filos (A) e gêneros (B) de bactérias presentes nas fezes dos animais WT ou IL-17R$^{-/-}$ por seqüenciamento da região 16S bacteriana. Os valores representam a porcentagem dos diferentes filos ou gêneros de bactérias presentes nas fezes dos animais após consumo de DN ou DH.

4.14 Efeito da DH na expressão do receptor de IL-17 em células epiteliais e da LP intestinal.

Por fim, nosso último objetivo foi comprovar se o consumo de uma dieta rica em gorduras desencadeia mudanças no perfil de expressão gênica do receptor de IL-17 nas células epiteliais (CE) e da LP intestinal. Para isso, foram isoladas CE e da LP de camundongos WT submetidos à DN ou DH. Em paralelo, essas células foram estimuladas com concentrações crescentes de IL-17 recombinante (IL-17r) e após 24 horas do estímulo, foi coletado o sobrenadante da cultura para dosagem das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 por ELISA. Embora não observamos diferenças estatisticamente significativas na expressão do receptor de IL-17, tanto nas CE como a LP, houve um aumento relativo da expressão desse receptor nas CE **(Figuras 14 A e B)**. De acordo com os resultados in vivo, também detectamos uma tendência ao aumento da expressão protéica das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 no sobrenadante da cultura de CE isoladas de camundongos que consumiram DH após estimulação com IL-17 na concentração de 100ng/mL **(Figuras 14 C e D)**. O mesmo fenômeno não foi observado nas células da LP **(Figuras 14 E e F)**. Esses dados indicam que a sinalização IL-17/IL-17R acarreta a expressão das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 nas células epiteliais intestinais, as quais estão associadas ao recrutamento de neutrófilos para a mucosa intestinal.

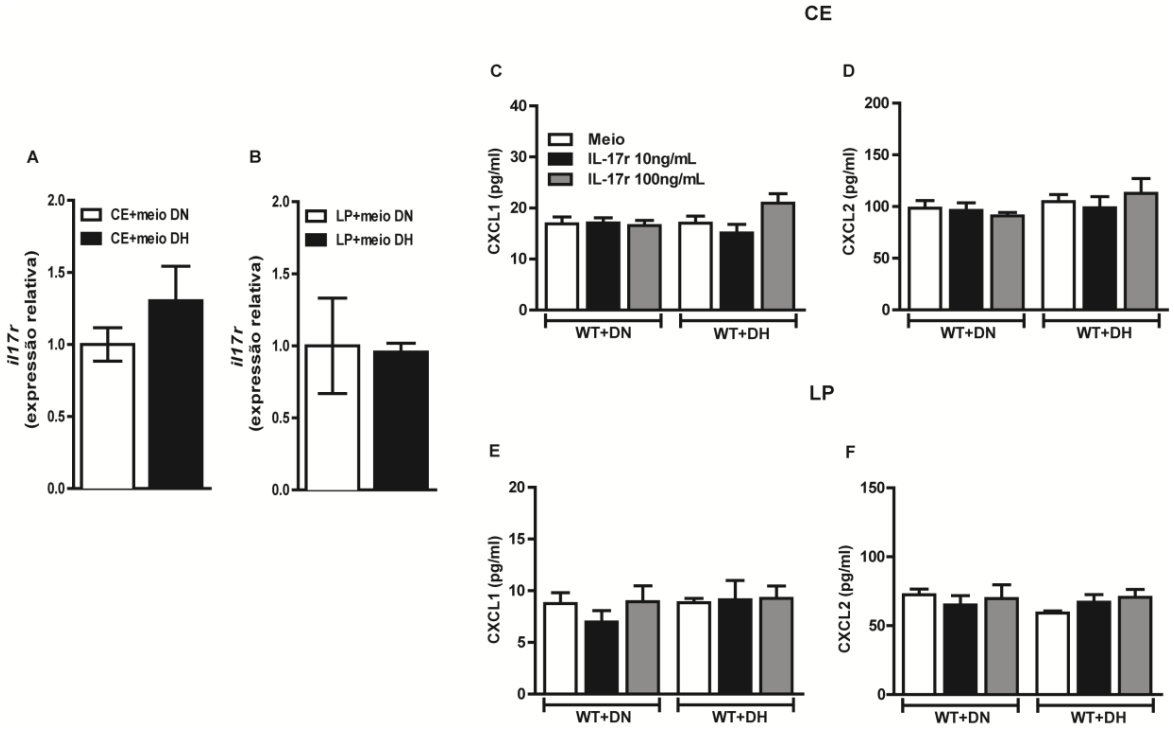

Figura 14: Expressão gênica do receptor de IL-17 e protéica das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 no sobrenadante da cultura de células epiteliais (CE) e da lâmina própria intestinal (LP). As células foram isoladas de camundongos WT submetidos a dieta controle (DN) ou dieta hiperlipidica (DH). Expressão relativa de IL-17R nas CE e LP (A e B). Após o estímulo por 24 horas com meio de cultura, IL-17 recombinante nas concentrações de 10 ng/mL ou 100 ng/mL, foram coletados os sobrenadantes das CE (C e D) ou da LP intestinal (E e F). A quantificação das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA). Os valores são expressos como a média±desvio padrão; N=5 animais por grupo. As comparações entre grupos foram feitas utilizando a análise de variância ("oneway" ANOVA)) e quando diferenças foram encontradas os dados foram comparados aos pares pelo teste não paramétrico, pós- teste de Tukey.

5. Discussão

5. Discussão

De acordo com nossos resultados, foi observada uma regulação positiva das citocinas relacionadas com um padrão de células Th17 intestinais durante o consumo de uma dieta rica em gorduras. Já foi descrito na literatura que estas células reforçam a TJ intestinais através do aumento das associações entre as proteínas claudina 1 e 2 na membrana das células epiteliais (Kinugasa, Sakaguchi et al. 2000). Além disso, elas promovem a produção de peptídeos antimicrobianos, induzem os genes relacionados com as mucinas e influenciam na expressão de quimiocinas como CXCL-1 e CXCL-2, importantes para o recrutamento dos neutrófilos, que controlam a homeostase das populações de bactérias do intestino (Chen, Thai et al. 2003; Aujla, Dubin et al. 2007). Como modelos experimentais e pacientes diabéticos apresentam alterações da barreira intestinal e nas populações de microrganismos presentes no trato gastrointestinal, nosso próximo passo foi avaliar a implicação da IL-17 na resposta inflamatória intestinal e metabólica observada no DM2 em camundongos submetidos a uma DH.

Como próximo objetivo fomos avaliar as principais populações de células produtoras da IL-17 nos linfonodos mesentéricos e na LP intestinal de camundongos submetidos à DH. Nossos dados mostraram o aumento da população de células Th17, mas não de células Tγδ produtoras de IL-17, na LP intestinal após o consumo de DH. De fato, um trabalho recentemente publicado demonstrou que camundongos submetidos a uma dieta rica em gorduras houve um aumento das populações de células Th17 e Tγδ no linfonodo inguinal e nos tecidos adiposo inguinal e epididimal quando comparados com os animais com dieta controle (Zuniga, Shen et al. 2010). Além disso, é plausível que a ocorrência do desbalanço das populações de bactérias presentes no intestino em resposta a uma dieta rica em lipídeos promova a diferenciação/expansão das células Th17 na LP a fim de controlar a replicação e colonização de bactérias comensais e assim, contribuir na manutenção da integridade da barreira intestinal.

Posteriormente, nos avaliamos a influência do eixo IL-17/IL-17R em parâmetros relacionados à obesidade tais como ganho do peso corporal, variação do peso, ingestão alimentar e ingestão calórica. Interessantemente, foi observado

que camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos a uma dieta hiperlipídica foram protegidos do ganho de peso corporal. Uma possível explicação para o menor ganho de peso nesses animais seria uma menor digestão e absorção intestinal de lípideos da dieta devido ao comprometimento intestinal. Por outro lado, esses mesmos animais apresentavam níveis de glicemia do jejum e após GTT, elevados no sangue quando comparados com os animais WT com a mesma dieta. Em paralelo, foi verificado níveis elevados de insulina séricos ou hiperinsulinemia nesses animais, sugerindo um estado de pré-diabetes.

Apesar de maior produção de insulina, os animais IL-17R$^{-/-}$ submetidos a uma dieta hiperlipídica apresentaram hiperglicemia, sugerindo um defeito na cascata de sinalização da insulina. De fato, foi constatada reduzida fosforilação de quinases importantes nessa via de sinalização como PI3K e AKT. Na obesidade, a inflamação metabólica é desencadeada pela ativação de células residentes do tecido adiposo como adipócitos e as células imunológicas, que secretam citocinas em resposta aos produtos liberados pelo metabolismo como ácidos graxos ou mesmo componentes microbianos provenientes da microbiota intestinal. O efeito prejudicial do TNF-α decorre da sua ação na fosforilação em resíduos de serina do IRS-1, que reduz o acoplamento deste substrato ao receptor da insulina e inibe sua função. Outro componente associado à inflamação metabólica é o LPS, que atinge tecidos metabólicos e pode interagir com receptores presentes na superfície das células como TLR4/CD14, levando a ativação de fatores de transcrição nucleares, que podem interferir de maneira direta ou indireta na resistência à insulina (Gual, Le Marchand-Brustel et al. 2005; Cani, Delzenne et al. 2008; He, Shan et al. 2015).

Na fase que precede o início do DM2, as células β pancreáticas sofrem um processo de proliferação/maturação na tentativa de normalizar os níveis elevados de glicose no sangue, caracterizado como hiperplasia. Além disso, existem relatos na literatura evidenciando que camundongos e pacientes diabéticos são capazes de produzir progressivamente maiores quantidades de insulina como decorrência do aumento do tamanho das ilhotas pancreáticas (Tourrel, Bailbe et al. 2002). De maneira notável, a análise histológica de cortes do tecido pancreático confirmou um processo de hiperplasia das ilhotas pancreáticas nos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos a uma dieta hiperlipídica. Em paralelo, também foi observado maior

expressão de células β produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas, que corrobora com o estado de hiperinsulinemia nesses animais.

A resistência à insulina é uma condição multifatorial e anormalidades no metabolismo lipídico ocorrem no estado de resistência a esse hormônio podendo ser tanto causa como consequência (Henriksen, Diamond-Stanic et al. 2011). O conceito de lipotoxicidade sustenta que o aumento de ácidos graxos livres na circulação e o acúmulo de lipídios no músculo e fígado podem levar à resistência insulínica (Samuel and Shulman 2012). Embora os animais IL-17R$^{-/-}$ apresentarem hiperglicemia e maior resistência à insulina, os níveis de colesterol e triglicerídeos séricos mantiveram-se inalterados e não detectamos acúmulo de gordura nos hepatócitos. Todavia, os resultados mostraram um infiltrado inflamatório intenso na LP intestinal associado à destruição das microvilosidades intestinais no íleo desses animais após uma dieta rica em gorduras. Esses resultados nos permitem propor que a deficiência de IL-17R causou uma inflamação associada à lesão intestinal, que provavelmente impediu a absorção e subsequente deposição de lipídeos no tecido adiposo e fígado (Chen, Thai et al. 2003; Ishigame, Kakuta et al. 2009; Iwakura, Ishigame et al. 2011).

Com o intuito de esclarecer o exato papel da IL-17 na imunidade intestinal durante o DM2, quantificamos a expressão do receptor CXCR-2 e das quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos, como CXCL-1 e CXCL-2. Como esperado, houve uma diminuição da expressão do receptor CXCR2 no intestino de os animais WT e IL-17R$^{-/-}$ após dieta hiperlipídica. A IL-17 tem sido reportada como uma citocina importante na granulopoiese, através da expressão de G-CSF e migração dos neutrófilos para o intestino através da indução de quimiocinas como CXCL-1, CXCL-2 e CXCL-5 nas células epiteliais intestinais, macrófagos e fibroblastos (Ye, Rodriguez et al. 2001; Fournier and Parkos 2012). De fato, observamos em animais IL-17R$^{-/-}$ reduzida expressão de CXCL-1 no intestino, sugerindo menor recrutamento de neutrófilos na LP desses animais. Em suporte, também foi verificado que em pacientes diabéticos umas das principais causas de infecções bacterianas é a falha na migração e atividade microbicida dos neutrófilos (Sannomiya, Pereira et al. 1990; Hatanaka, Monteagudo et al. 2006), fato que poderia ter sido potencializado na falta da citocina IL-17.

Posteriormente com o objetivo de entender a influencia da IL-17 na homeostase intestinal durante o DM2, avaliamos o perfil de células inflamatórias nos LMNs, com ênfase nos neutrófilos, macrófagos e DCs. De maneira interessante, foi observado o acúmulo dos neutrófilos neste local de camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos a uma dieta hiperlipídica, quando comparados aos animais do mesmo grupo com uma dieta controle. Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune que aumentam nos LMN e são recrutados para o tecido adiposo e LP intestinal mediante um processo inflamatório após DH. A presença destes neutrófilos no tecido adiposo ocorre após 3 dias de DH, o que indica que esse recrutamento acontece de maneira rápida e transiente (Elgazar-Carmon, Rudich et al. 2008). Em outro estudo mais recente, foi demonstrado o papel benéfico dos neutrófilos na manutenção do equilíbrio das populações de bactérias presentes no intestino por induzir a produção da proteína lipocalina induzida por gelatinase do neutrófilo (NGAL) nas células epiteliais, nas criptas e nas células de Paneth. Esta proteína parece ter um papel bacteriostático potente, já que foi capaz de regular o crescimento da bactéria *E.coli* no modelo de peritonite (Mori, Suzuki et al. 2016).

Ao avaliarmos a população de DCs CD11b^{-}CD103^{+} nos LMNs, foi detectada uma tendência ao aumento no número absoluto desta sub-população nos animais WT ou IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH quando comparados com os mesmos camundongos submetidos à DN. Este dado sugere que a dieta rica em gorduras parece ter um efeito na migração de células CD11b^{-}CD103^{+} para os LMN. Essa proposição é plausível, uma vez que a dieta hiperlipídica é capaz de alterar o perfil de microrganismos residentes no intestino, e como consequência aumentar as populações celulares relacionadas com o controle da homeostase intestinal. Também foi demonstrado que estas células em condições de inflamação expressam receptores TLR5, que após estímulo com flagelina proveniente da microbiota intestinal medeia à diferenciação de células Th17 intestinais. Em adição, estas células são capazes de produzir IL-23, que atua sobre as células linfóides inatas (ILC) promovendo a produção de IL-22 e em células epiteliais induzindo a síntese de peptídeos antimicrobianos como REGIIIγ (Farache, Zigmond et al. 2013).

Os macrófagos anti-inflamatórios CD11b^{+}CX3CR^{+} também tem sido descritos no controle da homeostase intestinal, já que foi visto que essas células são

responsáveis pela indução/função das células Tregs intestinais, devido a secreção de IL-10 que promove a expressão de Foxp3 e a atividade supressora dessas células (Schulz, Jaensson et al. 2009; Farache, Zigmond et al. 2013). Outro dado interessante é que o ATP gerado por alguns filos de bactérias comensais induz a expansão de uma população de células intestinais $CX3CR1^{+}$ capazes de induzir a diferenciação de células Th17, porém ainda não está claro se estas células são os macrófagos residentes (Molloy, Bouladoux et al. 2012). Recentemente, um estudo demonstrou que camundongos deficientes de CX3CR1 apresentaram reduzido número de macrófagos na LP, maior translocação de bactérias para os LMNs e maior gravidade da colite quando comparados com os animais controles (Medina-Contreras, Geem et al. 2011). De acordo, nossos dados demonstraram que camundongos $IL\text{-}17R^{-/-}$ também tiveram maior número desses macrófagos nos LMNs, o qual poderia estar correlacionado com a tentativa do sistema imune de compensar a ausência da sinalização do eixo IL-17/IL-17R, aumentando o número destas células importantes no controle da homeostase intestinal.

Tendo em vista que pacientem obesos e diabéticos apresentam um comprometimento da barreira intestinal e aumento da permeabilidade (Cani, Bibiloni et al. 2008; Cani and Delzenne 2009), nos fomos avaliar se a deficiência de IL-17 interfere na manutenção da integridade intestinal, e se esse fenômeno estaria associado ao aumento da translocação bacteriana e endotoxemia metabólica.Como esperado, detectamos que a DH causa aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia, porém a deficiência do IL-17R não agravou essas alterações intestinais após DH ou DN. Em contrapartida, foi observada alta carga bacteriana nos sangue desses animais quando comparados com os WT com as mesmas dietas. Nossos dados convergem com os dados obtidos na literatura de que camundongos obesos apresentam alterações na permeabilidade intestinal após 16 semanas do consumo de dieta hiperlipídica em associação com menor expressão de proteínas relacionadas com manutenção das TJ, evidenciando que a ruptura na barreira intestinal parece ser um evento mais tardio (Suzuki and Hara 2010). Ainda, outro estudo não verificou diferenças na permeabilidade intestinal entre indivíduos obesos e magros, embora tenha sido observado alterações nas populações de bactérias no intestino (Brignardello, Morales et al. 2010).

Outro dado intrigante é que não houve diferenças dos níveis de LPS circulantes entre os animais estudados. O LPS é uma molécula que atravessa as células epiteliais através de transporte transcelular através das células epiteliais presentes na monocamada intestinal. Este tipo de transporte permite a captação de nutrientes, albumina, hormônios, bactérias e seus produtos como o LPS do lúmen intestinal até o espaço intersticial através da formação de vesículas. Foi observado que em pacientes diabéticos existe o aumento deste tipo de transporte através das células M do intestino (Komarova and Malik 2010; Harris, Kassis et al. 2012; Caricilli and Saad 2013). Durante o consumo de uma dieta rica em lipídeos, também ocorre a formação dos quilomicrons, os quais possuem alta afinidade pela fração insolúvel (lipídeo A) da estrutura do LPS, permitindo o transporte transcelular desta molécula desde o intestino até a circulação e outros tecidos como fígado, músculo e tecido adiposo (Ghoshal, Witta et al. 2009; Harris, Kassis et al. 2012; Moreira, Texeira et al. 2012). O transporte do LPS por quilomícrons pode representar um mecanismo fisiológico que favorece a remoção hepática do LPS. Entretanto, uma condição patológica induzida pelo alto consumo de DH leva a um excessivo acúmulo de quilomícrons, aumentando a possibilidade de extravasamento extra-hepático do LPS (Moreira, Texeira et al. 2012). Assim, acreditamos que não houve diferenças na detecção de LPS entre os grupos porque a maioria do LPS translocado, seja através do transporte transcelular ou paracelular, esteja retido em outro compartimento.

Posteriormente, fomos investigar mais detalhadamente a permeabilidade intestinal e translocação bacteriana. Para tal, nós avaliamos a expressão gênica das proteínas claudina-2 e ocludina, assim como moléculas que formam parte da camada de muco presente no epitélio intestinal como as mucinas 1 e 2. É importante mencionar que a proteína claudina- 2 é uma molécula formadora de poros na membrana dos enterócitos, cuja expressão aumentada está diretamente relacionada com o comprometimento da barreira intestinal. Por outro lado, a expressão aumentada de ocludina é indicativa de maior integridade intestinal (Bischoff, Barbara et al. 2014). Foi observada uma menor expressão de claudina-2 e maior de ocludina no íleo dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos a uma dieta hiperlipídica, sugerindo uma possível redução da permeabilidade intestinal nesses animais. Apesar dos resultados divergirem da nossa hipótese de que a maior gravidade do DM2 nos

animais IL-17R$^{-/-}$ estaria associado ao aumento da permeabilidade, estão de acordo com os níveis menores de LPS detectado no soro desses animais. Ainda, foi observado aumento na expressão gênica de mucina-1 no íleo dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à dieta DH quando comparados com os animais WT com a mesma dieta. Sendo assim, é possível que 9 semanas de dieta seja um período insuficiente para observar alterações conclusivas na expressão de moléculas relacionadas com a manutenção da integridade intestinal.

Nosso próximo passo foi avaliar as populações de bactérias presentes nas fezes dos grupos de animais estudados por análise metagenômica do gene bacteriano 16S. Nossos resultados revelaram a prevalência dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* em relação aos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria* nas fezes dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH quando comprados com WT com a mesma dieta. Além disso, foi observada a diminuição do filo *Verrucomicrobia* nas fezes dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ com DH. De maneira interessante, a análise dos gêneros de bactérias identificados nos quatro grupos de animais estudados, demonstram o aumento dos gêneros *Bacteroides* e *Sporosarcina* e a redução do gênero *Bifidobacterium* nas fezes dos camundongos IL-17R$^{-/-}$ submetidos à DH quando comparados com os WT com a mesma dieta. Neste sentido, alguns trabalhos apontam que existe uma correlação entre aumento da razão do filo *Firmicutes/Bacteroidetes*, e maiores índices de massa corporal em indivíduos e camundongos obesos (Cani and Delzenne 2009; Wu, Ma et al. 2010). No entanto, outros trabalhos corroboram com nossos resultados, mostrando uma diminuição da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* em indivíduos obesos quando comparados com os controles magros (Schwiertz, Taras et al. 2010). Ainda, surgiram outros estudos que não conseguiram estabelecer uma correlação direta entre a abundância destes filos de bactérias com o desenvolvimento de obesidade e DM2 (Duncan, Lobley et al. 2008). Um trabalho recente obteve resultados muito semelhantes, uma vez que observaram prevalência significativa dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* nas fezes dos indivíduos diabéticos quando comparados com os controles. Além disso, foi reportada a associação entre a elevada razão *Bacteroidetes/Firmicutes* e o aumento dos níveis de glicose sanguínea nos pacientes diabéticos (Larsen, Vogensen et al. 2010). No entanto, não encontraram alterações nos filos

Actinobacteria e *Verrucomicrobia* entre os grupos analisados. É importante destacar que bactérias gram-negativas representadas pelos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* possuem um potencial mais patogênico e inflamatório, o que por sua vez poderia justificar o agravamento da resistência à insulina e DM2 nos animais deficientes do receptor de IL-17 após DH.

Por outro lado, a bactéria *Bifidobacterium* tem sido reportada como fundamental na redução dos níveis de endotoxinas em roedores e melhora das funções da barreira intestinal influenciando assim, no controle da homeostase da glicose e a sensibilidade à insulina. Também foi correlacionado o aumento destas bactérias com a redução do infiltrado de macrófagos com um perfil pró-inflamatório no tecido adiposo visceral de camundongos (Cani, Neyrinck et al. 2007; Frazier, DiBaise et al. 2011). Em outro estudo, foi mostrado um aumento do gênero *Bacteriodes* na microbiota intestinal de pacientes obesos e foi associado com maior digestão de carboidratos, maior produção de acetato e subsequentemente aumento da absorção de energia quando comparados com os indivíduos magros (Abdallah Ismail, Ragab et al. 2011). Por outro lado, o gênero *Sporosarcin*a pertence ao filo *Firmicutes* e está relacionado com o metabolismo da carnitina em humanos (Zhu, Jameson et al. 2014). Em adição, essas bactérias também parecem estar envolvidas com a produção de uréia, porém não há relatos na literatura sobre o seu papel no DM2. Em conjunto, esses dados demonstram o papel importante do eixo IL-17/IL-17R no controle das populações de bactérias presentes no intestino,e sua possível influência no desenvolvimento de resistência à insulina e DM2.

Por fim, nosso último objetivo foi comprovar se o consumo de uma dieta rica em gorduras desencadeia mudanças no perfil de expressão gênica do receptor de IL-17 nas células epiteliais (CE) e da lâmina própria (LP) intestinal. Em paralelo, avaliamos o direto papel da IL-17 na expressão de quimiocinas, relacionadas com o recrutamento de neutrófilos, tanto em CE como de LP isoladas de animais submetidos a DH ou DN. Embora não observamos diferenças estatisticamente significativas na expressão do receptor de IL-17 tanto nas CE como a LP, houve uma tendência ao aumento da expressão desse receptor nas CE de animais diabéticos**.** Também detectamos aumentada expressão das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 no sobrenadante da cultura de CE, isoladas de camundongos que

consumiram DH, após estimulação com IL-17 na concentração de 100ng/mL, sendo que este aumento não foi observado nas células da LP. Em geral, esses dados mostram que a dieta hiperlipídica promove a expressão do receptor da IL-17 nas células epiteliais intestinais, tornando essas células mais propensas a ação da IL-17 produzida na mucosa intestinal. Com decorrência, sob o efeito da IL-17 essas células são capazes em produzir maiores concentrações de CXCL-1 e CXCL-2, as quais induzem o recrutamento de neutrófilos e conferem uma imunidade protetora contra bactérias patogênicas, prevenindo assim o DM2.

Em linhas gerais, esse trabalho demonstrou que a deficiência do eixo IL-17/IL-17R causou menor influxo de neutrófilos associado a um processo de disbiose intestinal com prevalência de bactérias gram-negativas após o consumo de DH, que resultou em disfunções metabólicas e inflamatórias e agravamento do DM2. Neste sentido, a IL-17 parece induzir a migração de neutrófilos na mucosa intestinal através da expressão de quimiocinas por células epiteliais, que controlam a replicação/translocação bacteriana e atrasam o início do DM2. Dessa forma, os dados apontam o tratamento com IL-17 como intervenção imunomoduladora na prevenção/reversão de doenças metabólicas e inflamatórias, assim como o DM2.

6. Conclusões

6. Conclusões

Os dados gerados durante o trabalho permitem concluir que:

- A regulação positiva das citocinas do padrão de resposta Th17 (IL-6, IL-17A e IL-22) no intestino de animais diabéticos;

- A principal população de células produtoras de IL-17 na lâmina própria intestinal são as células Th17 durante o DM2;

- A via de IL-17/IL-17R contribui para o ganho do peso corporal e indução de obesidade;

- A via de IL-17/IL-17R atrasa o desenvolvimento das disfunções metabólicas e da resistência à insulina, as quais estão associadas ao início do DM2;

- A via IL-17/IL-17R induz o recrutamento dos neutrófilos no intestino mediado por quimiocinas produzidas por células epiteliais;

A via IL-17/IL-17R modula a expressão de moléculas associadas à integridade da barreira intestinal, tais como as proteínas TJ e as mucinas;

- A via IL-17/IL-17R controla o processo disbiose intestinal e preveni a translocação de bactérias para o sangue.

7. Referências

7. Referências

Abdallah Ismail, N., S. H. Ragab, et al. (2011). "Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults." Arch Med Sci **7**(3): 501-507.

Ahmed, M. and S. L. Gaffen (2010). "IL-17 in obesity and adipogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **21**(6): 449-453.

Ajuebor, M. N., A. M. Das, et al. (1999). "Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10." J Immunol **162**(3): 1685-1691.

Amar, J., C. Chabo, et al. (2011). "Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment." EMBO Mol Med **3**(9): 559-572.

Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (2012). "Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years." Cell **148**(6): 1160-1171.

Atarashi, K., J. Nishimura, et al. (2008). "ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation." Nature **455**(7214): 808-812.

Atarashi, K., T. Tanoue, et al. (2010). "Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria." Vaccine **28**(50): 8036-8038.

Aujla, S. J., P. J. Dubin, et al. (2007). "Th17 cells and mucosal host defense." Semin Immunol **19**(6): 377-382.

Backhed, F., H. Ding, et al. (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15718-15723.

Bain, C. C. and A. M. Mowat (2011). "Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment." Eur J Immunol **41**(9): 2494-2498.

Bischoff, S. C., G. Barbara, et al. (2014). "Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy." BMC Gastroenterol **14**: 189.

BK, P. (2007). "Point: interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis." J. Appl. Physiol **102**(2): 814–816.

Boden, G., P. She, et al. (2005). "Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver." Diabetes **54**(12): 3458-3465.

Bogunovic, M., F. Ginhoux, et al. (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." Immunity **31**(3): 513-525.

Brignardello, J., P. Morales, et al. (2010). "Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function." Aliment Pharmacol Ther **32**(11-12): 1307-1314.

Burcelin, R. and C. Pomie (2016). "Gut Microbiota Cool-Down Burning Fat! The Immune Hypothesis." Trends Endocrinol Metab **27**(2): 67-68.

Cani, P. D., J. Amar, et al. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." Diabetes **56**(7): 1761-1772.

Cani, P. D., R. Bibiloni, et al. (2008). "Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice." Diabetes **57**(6): 1470-1481.

Cani, P. D. and N. M. Delzenne (2009). "Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota." Curr Opin Pharmacol **9**(6): 737-743.

Cani, P. D. and N. M. Delzenne (2009). "The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease." Curr Pharm Des **15**(13): 1546-1558.

Cani, P. D., N. M. Delzenne, et al. (2008). "Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding." Pathol Biol (Paris) **56**(5): 305-309.

Cani, P. D., A. M. Neyrinck, et al. (2007). "Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia." Diabetologia **50**(11): 2374-2383.

Cani, P. D., M. Osto, et al. (2012). "Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity." Gut Microbes **3**(4): 279-288.

Cao, A. T., S. Yao, et al. (2012). "Th17 cells upregulate polymeric Ig receptor and intestinal IgA and contribute to intestinal homeostasis." J Immunol **189**(9): 4666-4673.

Caporaso, J. G., J. Kuczynski, et al. (2010). "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." Nat Methods **7**(5): 335-336.

Caricilli, A. M. and M. J. Saad (2013). "The role of gut microbiota on insulin resistance." Nutrients **5**(3): 829-851.

Carmecini, T. F. (2012). "PREVALÊNCIA DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 NO BRASIL: Revisão bibliográfica." Anais do XVII Encontro de Iniciação Científica.

Chen, Y., P. Thai, et al. (2003). "Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop." J Biol Chem **278**(19): 17036-17043.

Cildir, G., S. C. Akincilar, et al. (2013). "Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage." Trends Mol Med **19**(8): 487-500.

de La Serre, C. B., C. L. Ellis, et al. (2010). "Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **299**(2): G440-448.

Denning, T. L. and C. A. Parkos (2013). "Neutrophils enlist IL-22 to restore order in the gut." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(31): 12509-12510.

Duncan, S. H., G. E. Lobley, et al. (2008). "Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss." Int J Obes (Lond) **32**(11): 1720-1724.

Elgazar-Carmon, V., A. Rudich, et al. (2008). "Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding." J Lipid Res **49**(9): 1894-1903.

Erridge, C., T. Attina, et al. (2007). "A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation." Am J Clin Nutr **86**(5): 1286-1292.

Farache, J., E. Zigmond, et al. (2013). "Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense." Immunol Cell Biol **91**(3): 232-239.

Ferretti, S., O. Bonneau, et al. (2003). "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger." J Immunol **170**(4): 2106-2112.

Fournier, B. M. and C. A. Parkos (2012). "The role of neutrophils during intestinal inflammation." Mucosal Immunol **5**(4): 354-366.

Frazier, T. H., J. K. DiBaise, et al. (2011). "Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury." JPEN J Parenter Enteral Nutr **35**(5 Suppl): 14S-20S.

Ghoshal, S., J. Witta, et al. (2009). "Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides." J Lipid Res **50**(1): 90-97.

Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel, et al. (2005). "Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation." Biochimie **87**(1): 99-109.

Guariguata, L., D. R. Whiting, et al. (2014). "Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035." Diabetes Res Clin Pract **103**(2): 137-149.

Hadis, U., B. Wahl, et al. (2011). "Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria." Immunity **34**(2): 237-246.

Harris, K., A. Kassis, et al. (2012). "Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders?" J Obes **2012**: 879151.

Hatanaka, E., P. T. Monteagudo, et al. (2006). "Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes." Clin Exp Immunol **146**(3): 443-447.

He, C., Y. Shan, et al. (2015). "Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes." Nutr Res **35**(5): 361-367.

Henriksen, E. J., M. K. Diamond-Stanic, et al. (2011). "Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes." Free Radic Biol Med **51**(5): 993-999.

Ishigame, H., S. Kakuta, et al. (2009). "Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses." Immunity **30**(1): 108-119.

Ivanov, II, L. Frutos Rde, et al. (2008). "Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine." Cell Host Microbe **4**(4): 337-349.

Iwakura, Y., H. Ishigame, et al. (2011). "Functional specialization of interleukin-17 family members." Immunity **34**(2): 149-162.

Johansson-Lindbom, B., M. Svensson, et al. (2005). "Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing." J Exp Med **202**(8): 1063-1073.

Kammoun, H. L., M. J. Kraakman, et al. (2014). "Adipose tissue inflammation in glucose metabolism." Rev Endocr Metab Disord **15**(1): 31-44.

Khodabandehloo, H., S. Gorgani-Firuzjaee, et al. (2016). "Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and beta-cell dysfunction." Transl Res **167**(1): 228-256.

Kinnebrew, M. A., C. G. Buffie, et al. (2012). "Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense." Immunity **36**(2): 276-287.

Kinugasa, T., T. Sakaguchi, et al. (2000). "Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators." Gastroenterology **118**(6): 1001-1011.

Komarova, Y. and A. B. Malik (2010). "Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways." Annu Rev Physiol **72**: 463-493.

Kuhl, A. A., H. Kakirman, et al. (2007). "Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils." Gastroenterology **133**(6): 1882-1892.

Larsen, N., F. K. Vogensen, et al. (2010). "Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults." PLoS One **5**(2): e9085.

Lee, S. H., P. M. Starkey, et al. (1985). "Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80." J Exp Med **161**(3): 475-489.

Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, et al. (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." Nature **444**(7122): 1022-1023.

Li, P. and G. S. Hotamisligil (2010). "Metabolism: Host and microbes in a pickle." Nature **464**(7293): 1287-1288.

Li, Y., A. Karlin, et al. (2004). "Determination of the critical concentration of neutrophils required to block bacterial growth in tissues." J Exp Med **200**(5): 613-622.

Liu, S., J. Ren, et al. (2015). "IL-17RA in intestinal inflammation: structure, signaling, function, and clinical application." Inflamm Bowel Dis **21**(1): 154-166.

Masjkur, J., S. W. Poser, et al. (2016). "Endocrine Pancreas Development and Regeneration: Noncanonical Ideas From Neural Stem Cell Biology." Diabetes **65**(2): 314-330.

Mauer, J., B. Chaurasia, et al. (2014). "Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin." Nat Immunol **15**(5): 423-430.

Medina-Contreras, O., D. Geem, et al. (2011). "CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice." J Clin Invest **121**(12): 4787-4795.

Molloy, M. J., N. Bouladoux, et al. (2012). "Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses." Semin Immunol **24**(1): 58-66.

Mora, J. R., M. Iwata, et al. (2006). "Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells." Science **314**(5802): 1157-1160.

Moreira, A. P., T. F. Texeira, et al. (2012). "Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia." Br J Nutr **108**(5): 801-809.

Mori, K., T. Suzuki, et al. (2016). "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates gut microbiota of mice." J Gastroenterol Hepatol **31**(1): 145-154.

Murakami, Y., S. Tanabe, et al. (2016). "High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice." J Food Sci **81**(1): H216-222.

Nishimura, S., I. Manabe, et al. (2009). "CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." Nat Med **15**(8): 914-920.

O'Connor, W., Jr., L. A. Zenewicz, et al. (2010). "The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function." Nat Immunol **11**(6): 471-476.

Oh, D. Y., H. Morinaga, et al. (2012). "Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice." Diabetes **61**(2): 346-354.

Palm, N. W., M. R. de Zoete, et al. (2014). "Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease." Cell **158**(5): 1000-1010.

Persson, E. K., C. L. Scott, et al. (2013). "Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function." Eur J Immunol **43**(12): 3098-3107.

Qatanani, M. and M. A. Lazar (2007). "Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu." Genes Dev **21**(12): 1443-1455.

Raab, Y., B. Gerdin, et al. (1993). "Neutrophil mucosal involvement is accompanied by enhanced local production of interleukin-8 in ulcerative colitis." Gut **34**(9): 1203-1206.

Rotter, V., I. Nagaev, et al. (2003). "Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects." J Biol Chem **278**(46): 45777-45784.

Saito, T., H. Hayashida, et al. (2007). "Comment on: Cani et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance: Diabetes 56:1761-1772." Diabetes **56**(12): e20; author reply e21.

Samuel, V. T. and G. I. Shulman (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." Cell **148**(5): 852-871.

Sannomiya, P., M. A. Pereira, et al. (1990). "Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants." Agents Actions **30**(3-4): 369-376.

Schinner, S., W. A. Scherbaum, et al. (2005). "Molecular mechanisms of insulin resistance." Diabet Med **22**(6): 674-682.

Schulz, O., E. Jaensson, et al. (2009). "Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions." J Exp Med **206**(13): 3101-3114.

Schutyser, E., S. Struyf, et al. (2003). "The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6." Cytokine Growth Factor Rev **14**(5): 409-426.

Schwiertz, A., D. Taras, et al. (2010). "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects." Obesity (Silver Spring) **18**(1): 190-195.

Serino, M., E. Luche, et al. (2012). "Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota." Gut **61**(4): 543-553.

Shen, J., M. S. Obin, et al. (2013). "The gut microbiota, obesity and insulin resistance." Mol Aspects Med **34**(1): 39-58.

Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." J Clin Invest **106**(2): 171-176.

Sommer, F. and F. Backhed (2013). "The gut microbiota--masters of host development and physiology." Nat Rev Microbiol **11**(4): 227-238.

Stephens, J. M. and P. H. Pekala (1991). "Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **266**(32): 21839-21845.

Stumvoll, M., B. J. Goldstein, et al. (2005). "Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy." Lancet **365**(9467): 1333-1346.

Suzuki, T. (2013). "Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions." Cell Mol Life Sci **70**(4): 631-659.

Suzuki, T. and H. Hara (2010). "Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats." Nutr Metab (Lond) **7**: 19.

Tagliabue, A. and M. Elli (2013). "The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives." Nutr Metab Cardiovasc Dis **23**(3): 160-168.

Taylor, P. R., S. Roy, et al. (2014). "Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, RORgammat and dectin-2." Nat Immunol **15**(2): 143-151.

Tourrel, C., D. Bailbe, et al. (2002). "Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4." Diabetes **51**(5): 1443-1452.

Turnbaugh, P. J., V. K. Ridaura, et al. (2009). "The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice." Sci Transl Med **1**(6): 6ra14.

Varol, C., A. Vallon-Eberhard, et al. (2009). "Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions." Immunity **31**(3): 502-512.

Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, et al. (2010). "Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5." Science **328**(5975): 228-231.

Winkler, G. and K. Cseh (2009). "[Molecular mechanisms and correlations of insulin resistance, obesity, and type 2 diabetes mellitus]." Orv Hetil **150**(17): 771-780.

Wu, X., C. Ma, et al. (2010). "Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes." Curr Microbiol **61**(1): 69-78.

Yamada, T., B. J. Zimmerman, et al. (1991). "Role of neutrophils in acetic acid-induced colitis in rats." Inflammation **15**(5): 399-411.

Ye, P., F. H. Rodriguez, et al. (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J Exp Med **194**(4): 519-527.

Zhang, H. H., M. Halbleib, et al. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP." Diabetes **51**(10): 2929-2935.

Zhang, R., S. Ito, et al. (2011). "Up-regulation of Gr1+CD11b+ population in spleen of dextran sulfate sodium administered mice works to repair colitis." Inflamm Allergy Drug Targets **10**(1): 39-46.

Zhu, Y., E. Jameson, et al. (2014). "Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(11): 4268-4273.

Zuniga, L. A., W. J. Shen, et al. (2010). "IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity." J Immunol **185**(11): 6947-6959.