ANGELA CASTOLDI

**MyD88: UM MODULADOR DO PERFIL
INFLAMATÓRIO E METABÓLICO
NA OBESIDADE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo
2015

ANGELA CASTOLDI

**MyD88: UM MODULADOR DO PERFIL
INFLAMATÓRIO E METABÓLICO
NA OBESIDADE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Castoldi, Angela.

MyD88: um modulador do perfil inflamatório e metabólico na
obesidade experimental / Angela Castoldi. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:
Imunologia. Linha de pesquisa: Imunometabolismo.

Versão do título para o inglês: MyD88: a modulator of inflammatory
and metabolic profile in experimental obesity.

1. Inflamação 2. Obesidade 3. Macrófagos 4. Microbiota 5. Tecido
Adiposo 6. Resistência à insulina I. Câmara, Prof. Dr. Niels Olsen
Saraiva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB088/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Angela Castoldi.

Título da Tese: MyD88: um modulador do perfil inflamatório e metabólico na
obesidade experimental.

Orientador(a): Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **122** nas fls. **134** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Niels Olsen Saraiva Câmara**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Novos mecanismos celulares, moleculares e imunológicos nas lesões renais agudas e crônicas: busca por novas estratégias terapêuticas*" do qual participam o(s) aluno(s), **Andrea Moro Caricilli, Mariane Tami Amano, Maristella Vitta Landgraf, Andrea Rodas, Enio José Bassi, Matheus Correa Costa, Tarcio Teodoro Braga, Daniel May de Oliveira Angela Castoldi, Marina Burges da Silva, Cristhiane Favero de Aguiar, Sandrina Carla Moreira Rendall de Sá, Mariana Miyagi, Milene Nakaqawa, Vitor Higa, Yuri Felipe Guise de Souza, Felipe Grabarz, Rafael Luiz Pereira, Vinicius Andrade Oliveira** e o pesquisador **Jean Pierre Peron**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **18.10.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 22 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico esta tese a toda minha família!

Sem eles nada seria possível!

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades;

Ao Niels, agradeço de coração por ter me recebido em seu laboratório, confiando e acreditando em mim. Obrigada por todo o apoio e incentivo desde o início e por permitir que possamos crescer como pessoas e como cientistas. Obrigada por me encorajar a enfrentar novos desafios;

À minha família, que sempre me motivou, entendeu as minhas faltas e a distância e me mostrou o quanto era importante estudar e correr atrás dos meus sonhos;

Ao Michel, por me apoiar em todas as escolhas nos últimos 12 anos suportando a distância em busca dos nossos sonhos;

À minha prima Gi, por fazer com que eu me sinta perto de casa mesmo estando longe e pelo carinho e paciência com que leu essa tese;

À Mary, pelo companheirismo, amizade e agradável convívio dentro e fora do laboratório. Por sempre ter me ajudado, inspirado e incentivado;

Ao Pedro, pela amizade, pelas discussões, incentivo e todo o suporte científico em Boston e ao longo do meu doutorado, contribuindo para a minha formação;

À Marcelli, por toda a ajuda durante os últimos anos do doutorado, muito obrigada por ter cuidado dos meus experimentos enquanto eu estava fora;

Ao Zidane, pela amizade, convívio agradabilíssimo durante todo o doutorado, pelos cafés e toda a ajuda no desenvolvimento desse trabalho;

À Cris, minha parceira nos experimentos, por ter me ajudado sempre que precisei e pelos momentos de descontração no laboratório e nas viagens;

À Marcela, pela amizade, e companheirismo durante o inverno gelado de Boston.

Aos meus velhos e novos amigos do laboratório, Marina, Tércio, Matheus, Candinho, Reinaldo, Dênis, Raphael, Camila, Clarice, Aline, Cristiane, Iris, Rafael, Amanda, Felipe, Lis, Fernanda e Tom pela agradável companhia, momentos de descontração e colaboração para a realização deste trabalho;

À Meire e ao Marquinhos, pela amizade, paciência e por todo o suporte no laboratório;

À Claudinha, pela amizade e bom humor com que chega no laboratório todos os dias e por toda a ajuda;

Agradeço também aos colegas da UNIFESP;

À Prof. Bárbara B. Kahn, por ter me aceitado em seu laboratório contribuindo para a minha maturidade científica;

Ao Prof. William Festuccia pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho;

A todos os colegas e amigos de Boston, em especial a Jennifer, Pratik e Paty, por ter feito os meus dias mais agradáveis;

Estendo meus agradecimentos ao Paulo, por sempre ajudar prontamente na confecção das lâminas histológicas, à Maria Eni, sempre prestativa e eficiente, resolvendo nossos problemas burocráticos e ao Israel, por cuidar dos nossos camundongos;

Estendo meus agradecimentos ainda, aos funcionários do CEFAP, pelo auxílio nos experimentos de imagem e sequenciamento;

A todos os funcionários, professores e colaboradores do ICB IV USP;

A todos que de uma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos animais, sem eles essa tese não existiria;

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho recebeu auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processos: 2011/15682-4e 2012/02270-2

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Castoldi A. MyD88: um modulador do perfil inflamatório e metabólico na obesidade experimental [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: Nos últimos anos, a ativação de receptores da imunidade inata nas células do sistema imune e no tecido adiposo foi descrita como crucial durante o desenvolvimento da obesidade. Além disso, alterações na microbiota intestinal foram relacionadas aos fenótipos inflamatórios e metabólicos na obesidade através do aumento da permeabilidade intestinal, com elevação dos níveis sistêmicos de endotoxina, que colabora para o aumento da inflamação e o desenvolvimento da resistência à insulina. A complexidade do sistema imune nos permite explorar essas vias de sinalização nos diversos órgãos, tecidos e células. Por isso formulamos a hipótese de que MyD88 regularia o desenvolvimento da obesidade, desempenhando um papel importante no tecido adiposo contribuindo para a resistência à insulina. Nos macrófagos, a sinalização via MyD88 favoreceria um perfil pró-inflamatório, e ainda, regularia alterações na microbiota intestinal que por sua vez estariam contribuindo nesse processo através de alterações na permeabilidade intestinal. **Objetivo:** Estudar a relação entre a obesidade e inflamação, focando no papel da molécula adaptadora MyD88 e sua importância no tecido adiposo, macrófagos, intestino e na modulação da microbiota intestinal. **Métodos:** Utilizamos camundongos C57BL/6, deficientes de MyD88 (KO), *Adiponectina^{cre+}MyD88^{flox +/+}* e *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox +/+}* alimentados com dieta hiperlipídica e avaliamos os perfis metabólicos e inflamatórios, permeabilidade intestinal e alterações na microbiota intestinal. Ainda em um modelo de transplante de microbiota estudamos o possível papel da microbiota no desenvolvimento da obesidade. **Resultados:** Verificamos que camundongos MyD88 KO ganharam mais peso comparados aos camundongos WT, são mais intolerantes à glicose e resistentes à insulina. Porém, ao analisarmos o perfil inflamatório no tecido adiposo e sistêmico, observamos significativa diminuição de IL-1 β , TNF- α e IL-6 bem como diminuição na fosforilação das vias de sinalização pró-inflamatórias nos camundongos MyD88 KO obesos. No tecido adiposo, há um predomínio de macrófagos de perfil M1. Além disso, observamos menor inflamação no intestino, porém, a permeabilidade intestinal estava aumentada. A microbiota dos camundongos MyD88 KO foi capaz de induzir resistência à insulina nos camundongos WT, aumentou a permeabilidade intestinal e inflamação no tecido adiposo. A depleção de MyD88 no tecido adiposo não alterou o perfil metabólico dos camundongos comparados aos controles. No entanto, a depleção de MyD88 nos macrófagos, protegeu os camundongos do ganho de peso, resistência à insulina e do aumento da permeabilidade intestinal. Observamos maior polarização M2 no tecido adiposo desses camundongos. Ainda, camundongos MyD88 KO obesos não foram capazes de montar uma resposta inflamatória em resposta à sepse. No entanto, no tecido adiposo dos camundongos MyD88 KO obesos, observamos um aumento significativo da expressão de Dectina-1 e IFN- β , o que poderia explicar a resistência à insulina com a ausência da inflamação clássica. **Conclusão:** MyD88 desempenha um papel importante no desenvolvimento da obesidade modulando a microbiota e o perfil inflamatório.

Palavras-chave: MyD88. Obesidade. Resistência à insulina. Inflamação. Microbiota. Macrófagos. Tecido adiposo.

ABSTRACT

Castoldi A. MyD88: a modulator of inflammatory and metabolic profile in experimental obesity [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Background: Recently, activation of innate immune receptors in immune cells and adipose tissue has been described as crucial for the development of obesity. In addition, changes in intestinal microbiota have been related to inflammation in obesity and metabolic syndrome by increasing intestinal permeability, with increased systemic levels of endotoxin, which contributes to increases inflammation and development of insulin resistance. The complexity of the immune system allows us to explore these signaling pathways in different organs, tissues and cells. Therefore we hypothesized that MyD88 regulate the development of obesity and plays an important role in the adipose tissue contributing to insulin resistance. In addition, activation of MyD88 signaling pathway in macrophages would instigate a pro-inflammatory profile, and further, MyD88 would regulate changes in the intestinal microbiota which in turn may contribute to this process through changes in intestinal permeability. **Objective:** To study the relationship between obesity and inflammation, focusing on the role of the adapter molecule MyD88 and its importance in adipose tissue, macrophages, intestine and modulation of intestinal microbiota. **Methods:** We used C57BL/6, MyD88 (KO), Adiponectina^{cre+} MyD88^{flox+/+} and Lisoizima^{cre+} MyD88^{flox+/+} high fat diet-fed mice and evaluate the metabolic and inflammatory profiles, intestinal permeability and changes in intestinal microbiota. In addition, we performed a microbiota transplantation model to study the role of the microbiota on obesity development. **Results:** We observed an increased weight gain in MyD88 KO mice compared to WT mice, they are glucose intolerant and insulin resistant. However, we observed a significant decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IL-6 as well as decrease the phosphorylation of pro-inflammatory signaling pathways in the adipose tissue and serum of MyD88 KO obese mice. In adipose tissue, there is a predominance of M1 macrophages. Furthermore, we observed less inflammation in the gut, however, intestinal permeability was increased. The microbiota of MyD88 KO mice was able to induce insulin resistance in WT mice, increased intestinal permeability and inflammation in adipose tissue. Depletion of MyD88 in adipose tissue did not change the metabolic profile of mice compared to controls. However, depletion of MyD88 in macrophages, protected mice from weight gain and insulin resistance, as well the intestinal permeability and increased M2 polarization in the adipose tissue. Furthermore, MyD88 KO obese mice were not able to mount an inflammatory response in response to sepsis. However, in the adipose tissue of obese MyD88 KO mice, we observed a significant increase in Dectin-1 and IFN- β expression, which could explain the insulin resistance without classical inflammation. **Conclusion:** MyD88 plays an important role in the development of obesity and microbiota modulating the inflammatory profile.

Keywords: MyD88. Obesity. Insulin resistance. Inflammation. Microbiota. Macrophages. Adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise do ganho de peso dos camundongos MyD88 KO.....	59
Figura 2 - Análise do índice de gordura corporal dos camundongos MyD88 KO.....	59
Figura 3 - Análise do peso dos tecidos adiposos dos camundongos MyD88 KO.....	60
Figura 4 - Consumo de oxigênio / produção de dióxido de carbono e determinação da relação de troca respiratória (RER) dos camundongos MyD88 KO.....	60
Figura 5 - Atividade diária e noturna dos camundongos MyD88 KO.....	61
Figura 6 - Teste de tolerância à glicose nos camundongos MyD88 KO.....	62
Figura 7 - Dosagem da concentração de insulina no soro dos camundongos MyD88 KO.....	62
Figura 8 - Teste de tolerância à insulina nos camundongos MyD88 KO.....	63
Figura 9 - Análise da via de sinalização da insulina nos camundongos MyD88 KO.....	64
Figura 10 - Incorporação e oxidação de glicose no tecido adiposo epididimal dos camundongos MyD88 KO.....	64
Figura 11 - Análise do perfil inflamatório no tecido adiposo epididimal e fígado dos camundongos MyD88 KO.....	66
Figura 12 - Análise da inflamação sistêmica nos camundongos MyD88 KO.....	67
Figura 13 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal dos camundongos MyD88 KO.....	69
Figura 14 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no fígado dos camundongos MyD88 KO.....	70
Figura 15 - Análise do perfil inflamatório no intestino delgado dos camundongos MyD88 KO.....	72
Figura 16 - Análise do perfil inflamatório no intestino grosso dos camundongos MyD88 KO.....	73
Figura 17 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos MyD88 KO.....	75
Figura 18 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos MyD88 KO.....	76
Figura 19 - Imuno-histoquímica para ZO-1 no intestino delgado e intestino grosso dos camundongos MyD88 KO	76
Figura 20 - Análise da produção de defensinas e peptídeos antimicrobianos nos camundongos MyD88 KO.....	78

Figura 21 - Análise do infiltrado de macrófagos residentes no intestino dos camundongos MyD88 KO.....	80
Figura 22 - Análise do infiltrado de células dendríticas residentes no intestino dos camundongos MyD88 KO.....	82
Figura 23 - Análise do infiltrado de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ no intestino e linfonodo mesentérico dos camundongos MyD88 KO.....	83
Figure 24 - Análise da microbiota intestinal por sequenciamento, antes e após dieta hiperlipídica.....	85
Figura 25 - Análise do ganho de peso após o transplante de microbiota.....	86
Figura 26 - Análise do peso dos tecidos adiposos após transplante de microbiota.....	87
Figura 27 - Consumo de oxigênio / produção de dióxido de carbono e determinação da relação de troca respiratória (RER) nos camundongos transplantados.....	88
Figura 28 - Teste de tolerância à glicose após o transplante de microbiota.....	89
Figura 29 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal dos camundongos transplantados.....	90
Figura 30 - Expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo dos camundongos transplantados.....	90
Figura 31 - Análise da permeabilidade intestinal nos camundongos transplantados.....	91
Figura 32 - Análise da permeabilidade intestinal após o transplante de microbiota.....	92
Figura 33 - Análise do perfil inflamatório no intestino após o transplante de microbiota.....	93
Figura 34 - Análise da produção de peptídeos antimicrobianos após o transplante de microbiota.....	94
Figura 35 - Análise do infiltrado de macrófagos residentes no intestino após transplante de microbiota.....	95
Figura 36 - Análise do ganho de peso dos camundongos Adiponectina ^{Cre}	97
Figura 37 - Análise do peso dos tecidos adiposos dos camundongos Adiponectina ^{Cre}	97
Figura 38 - Consumo de oxigênio / produção de dióxido de carbono e determinação da relação de troca respiratória (RER) dos camundongos Adiponectina ^{Cre}	98
Figura 39 - Teste de tolerância à glicose dos camundongos Adiponectina ^{Cre}	99
Figura 40 - Teste de tolerância à insulina nos camundongos Adiponectina ^{Cre}	99

Figura 41 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal dos camundongos Adiponectina ^{Cre}	101
Figura 42 - Expressão de citocinas pró inflamatórias no tecido adiposo nos camundongos Adiponectina ^{Cre}	102
Figura 43 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos Adiponectina ^{Cre}	103
Figura 44 - Análise do ganho de peso dos camundongos Lisozima ^{Cre}	105
Figura 45 - Análise do peso dos tecidos adiposos nos camundongos Lisozima ^{Cre}	105
Figura 46 - Consumo de oxigênio / produção de dióxido de carbono e determinação da relação de troca respiratória (RER) dos camundongos Lisozima ^{Cre}	106
Figura 47 - Teste de tolerância à glicose dos camundongos Lisozima ^{Cre}	107
Figura 48 - Teste de tolerância à insulina nos camundongos Lisozima ^{Cre}	108
Figura 49 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal dos camundongos Lisozima ^{Cre}	109
Figura 50 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos Lisozima ^{Cre}	111
Figura 51 - Análise do perfil inflamatório após sepse polimicrobiana em camundongos MyD88 KO.....	112
Figura 52 - Ativação da via da Dectina no tecido adiposo dos camundongos MyD88 KO.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1 - Proteína ativadora 1

AKT - Proteína quinase

Bp - Pares de base

CD - Grupo de diferenciação, do inglês: *Cluster of differentiation*

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CFU - Unidade formadora de colônia

CLP - Ligadura e perfuração do cecum, do inglês *Cecal ligation and puncture*

CX₃CR₁ - Receptor 1 da quimiocina CX₃C, do inglês *chemokine (C-X₃-C motif) receptor 1*

CD_{11b} - Integrina alpha M

CD_{11c} - Integrina alpha X (ITGAX)

CCR - Receptor de quimiocina

DC - Célula dendrítica

DEF_{CR-1} - Defensina alpha, do inglês *Defensin-related cryptdin peptide-1*

ERK - Extracellular signal-regulated kinases

F_{4/80} - Antígeno expresso por macrófagos

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FOXP₃ - Fator de transcrição de células T reguladoras

GLUT - Transportador de glicose

GTT - Teste de tolerância à glicose

IFN - Interferon

IHQ - Imuno-histoquímica

IL - Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IP - Intraperitoneal

ITT - Teste de tolerância à insulina

IRAK - Quinase associada ao receptor de interleucina 1

IRF - Fator regulador de interferon

IκB - Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor

JNK - c-Jun N-terminal kinase

KO - Nocaute

LPS - Lipopolissacarídeo

LRR - Repetições ricas em leucina

M - Macrófago

MLN - Linfonodo mesentérico

MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88, do inglês *Myeloid Differentiation Factor 88*

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

NLR - Receptores do tipo NOD

NO - Óxido nítrico

PAMP - Padrão molecular associado ao patógeno

R - Receptor

RNA - Ácido ribonucleico

REGIII γ - Peptídeo antimicrobiano, do inglês *Regenerating islet-derived protein 3 gamma*

RER - Relação de troca respiratória

SyK - Tirosina quinase, do inglês *Spleen tyrosine kinase*

SSC - Parâmetro utilizado em citometria de fluxo, do inglês *side-scattered*

TIR - Toll interleucina 1 receptor, do inglês *Toll interleukin-1 receptor*

TIRAP - Proteína adaptadora da molécula TIR, do inglês *TIR adapter protein*

TJ - Junções apertadas, do inglês *tight junctions*

TLR - Receptores similares ao Toll

TNF - Fator de necrose tumoral

TGF - Fator de transformação de crescimento

TRIF - Domínio contendo adaptador interferon β induzido, do inglês *Domain containing adapter inducing interferon β*

TRAM - Molécula adaptadora relacionada ao TRIF, do inglês *TRIF-related adapter molecule*

ZO-1 - Proteína de oclusão paracelular, do inglês *Zonula occludens*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	FAMÍLIA DE RECEPTORES TOLL-LIKE E A MOLÉCULA ADAPTADORA MyD88	22
1.2	OBESIDADE.....	24
1.3	RECEPTORES DA IMUNIDADE INATA NO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE EXPERIMENTAL.....	26
1.4	MACRÓFAGOS E DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE	29
1.5	MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE.....	31
1.6	PERMEABILIDADE INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE.....	32
1.7	LÂMINA PRÓPRIA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE.....	34
2	OBJETIVOS	39
2.1	GERAL.....	40
2.2	ESPECÍFICOS.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	ANIMAIS.....	42
3.2	INDUÇÃO DA OBESIDADE	43
3.3	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E TOLERÂNCIA À INSULINA	44
3.4	CAPTAÇÃO DE GLICOSE E CONVERSÃO PARA SEUS METABÓLITOS <i>in vitro</i>	44
3.5	AVALIAÇÃO DE GORDURA CORPORAL.....	45
3.6	CONSUMO DE OXIGÊNIO/PRODUÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO E DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DE TROCA RESPIRATÓRIA (RER).....	46
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA, ADIPONECTINA E LEPTINA NO SORO.....	47
3.8	DETERMINAÇÃO DE LPS NO SORO.....	47
3.9	IMUNO-HISTOQUÍMICA	47
3.10	DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL PELA ANÁLISE DE FITC-DEXTRAN.....	48
3.11	DOSAGEM DE TRIGLICERÍDEOS E COLESTEROL.....	48

3.12	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL (SEQUENCIAMENTO).....	49
3.13	PURIFICAÇÃO DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS INFILTRANTES NO TECIDO ADIPOSEO, FÍGADO E INTESTINO E AVALIAÇÃO DOS FENÓTIPOS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
3.14	BIOPLEX.....	50
3.15	WESTERN BLOTTING	51
3.16	EXTRAÇÃO RNA E PREPARAÇÃO DO CDNA	51
3.17	PCR EM TEMPO REAL.....	52
3.18	CBA (CYTOMETRIC BEAD ARRAY)	53
3.19	CULTURA DE EXPLANTE DE INTESTINO.....	53
3.20	PROTOCOLO DE DEPLEÇÃO E TRANSFERÊNCIA DA MICROBIOTA.....	53
3.21	INDUÇÃO DA SEPSE POR CLP (ligadura e perfuração do ceco).....	54
3.22	CONTAGEM DE BACTÉRIAS NA CAVIDADE PERITONEAL.....	54
3.23	GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS.....	54
3.24	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4	RESULTADOS.....	57
4.1	ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO DOS CAMUNDONGOS SOB DIETA HIPERLIPÍDICA.....	58
4.2	A DEFICIÊNCIA DE MyD88 RESULTOU EM MAIOR INTOLERÂNCIA À GLICOSE	61
4.3	CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS DESENVOLVEM MAIOR RESISTÊNCIA À INSULINA	63
4.4	CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM MENOR INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSEO E NO FÍGADO	65
4.5	A DEFICIÊNCIA DE MyD88 ACARRETA EM MENOR INFLAMAÇÃO SISTÊMICA, AUMENTO DA SECREÇÃO DE LEPTINA E DIMINUIÇÃO DE ADIPONECTINA	66
4.6	CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM AUMENTO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS DO TIPO M1 (F4/80 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺) PARA O TECIDO ADIPOSEO E FÍGADO	68
4.7	CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS FALHAM EM PROMOVER INFLAMAÇÃO INTESTINAL.....	70
4.8	A AUSÊNCIA DE MyD88 LEVA A ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA	73
4.9	CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE DEFENSINAS E PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NO INTESTINO.....	77

4.10	CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM DIMINUIÇÃO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES (F4/80 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁻ CX3CR1 ⁺) NO INTESTINO.....	78
4.11	CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM AUMENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS RESIDENTES F480 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD103 ⁺ NO INTESTINO E DIMINUIÇÃO DE CÉLULAS T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	80
4.12	A AUSÊNCIA DE MyD88 MODULA A MICROBIOTA INTESTINAL APÓS DIETA HIPERLIPÍDICA	83
4.13	A MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO PROPICIOU ALTERAÇÕES METABÓLICAS NOS CAMUNDONGOS WT	85
4.14	CAMUNDONGOS WT TRANSPLANTADOS COM MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO DESENVOLVEM INTOLERÂNCIA À GLICOSE.....	88
4.15	CAMUNDONGOS WT TRANSPLANTADOS COM MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO APRESENTARAM AUMENTO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS COM FENÓTIPO M1 (F4/80 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺) PARA O TECIDO ADIPOSEO	89
4.16	MICROBIOTA DOS CAMUNDONGOS MyD88 KO AUMENTOU A PERMEABILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS WT	90
4.17	MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO INDUZIU INFLAMAÇÃO E DIMINUIU A EXPRESSÃO DE REGIII NO INTESTINO GROSSO DE CAMUNDONGOS WT	92
4.18	MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO DIMINUI A EXPRESSÃO DE CX3CR1 NO INTESTINO GROSSO E A FREQUÊNCIA DE MACRÓFAGOS RESIDENTES CD11c ⁻ CD11b ⁺ CX3CR1 ⁺	94
4.19	CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO DE MyD88 NO TECIDO ADIPOSEO DESENVOLVEM OBESIDADE SEMELHANTE AOS CONTROLES SELVAGENS.....	96
4.20	DELEÇÃO DE MyD88 NO TECIDO ADIPOSEO CONFERIU INTOLERÂNCIA À GLICOSE E RESISTÊNCIA À INSULINA SEMELHANTE AOS CONTROLES SELVAGENS.....	98
4.21	DELEÇÃO DE MyD88 NO TECIDO ADIPOSEO NÃO ALTEROU A MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA O TECIDO ADIPOSEO APÓS DIETA HIPERLIPÍDICA.....	99
4.22	DELEÇÃO DE MyD88 NO TECIDO ADIPOSEO NÃO PROTEGE OS CAMUNDONGOS DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	102
4.23	A DELEÇÃO DE MYD88 NOS MACRÓFAGOS PROTEGE OS CAMUNDONGOS DO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE	103
4.24	CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO DE MyD88 NOS MACRÓFAGOS APRESENTAM AUMENTO DA TOLERÂNCIA À GLICOSE E SENSIBILIDADE À INSULINA	106
4.25	DELEÇÃO DE MyD88 NOS MACRÓFAGOS INIBE A MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE FENÓTIPO M1 PARA O TECIDO ADIPOSEO	108
4.26	DELEÇÃO DE MyD88 NOS MACRÓFAGOS PROTEGE OS CAMUNDONGOS DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL	110
4.27	MyD88 É ESSENCIAL DURANTE UMA INFECÇÃO LETAL ASSOCIADA A OBESIDADE.....	110

4.28	A AUSÊNCIA DE MyD88 EXACERBOU A ATIVAÇÃO DE DECTINA E SUA VIA DE SINALIZAÇÃO	113
5	DISCUSSÃO	116
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
7	CONCLUSÕES	133
	REFERÊNCIAS	135
	ANEXOS	149
A -	Trabalho realizado durante o Doutorado Sanduíche com bolsa BEPE- 1.....	150
B -	Trabalho realizado durante o Doutorado Sanduíche com bolsa BEPE- 2.....	176
C -	Trabalho realizado durante o Doutorado Sanduíche com bolsa BEPE- 3.....	178
D -	Manuscritos publicados, aceitos para publicação e submetidos durante o doutorado	180
E -	Genotipagem	183

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA DE RECEPTORES TOLL-LIKE E A MOLÉCULA ADAPTADORA MyD88

Os receptores similares ao Toll (TLR) fazem parte de uma família de receptores transmembrânicos evolutivamente conservados caracterizados por um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio intracelular Toll/IL-1R (TIR- *Toll-interleukin-1 receptor*) devido a sua semelhança com os receptores da interleucina (IL)-1 (1), sendo expressos por células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos B e T, *natural killers* (NK) e por células parenquimatosas, epiteliais e endoteliais (2).

Existem no mínimo, quinze diferentes TLR em mamíferos, dos quais quase todos têm funções definidas nos seres humanos (3). Os TLR são divididos em duas categorias de grupos de receptores de membrana. Os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12 e TLR13 são encontrados na membrana da superfície celular e os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são encontrados nas membranas endossômicas. O TLR15, o mais recentemente descoberto, foi associado ao reconhecimento de componentes da salmonela (4, 5).

Quando ativados, os TLR desencadeiam sinalização intracelular que culmina com a síntese de compostos que podem eliminar o patógeno que ocorre pela ativação do fator de transcrição NF- κ B ou pelo fator de transcrição AP-1. Ambos são responsáveis pela transcrição de citocinas e quimiocinas. A ativação final do NF- κ B pode ser desencadeada por um sinal proveniente de um TLR e a via de sinalização pode ser dependente ou independente de MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene* (88)). A sinalização dependente de MyD88 é compartilhada por todos os TLR, exceto o TLR3. Se a via de ativação for independente de MyD88, o sinal proveniente dos TLR ativa NF- κ B através de outras duas moléculas adaptadoras, o TRIF (*domain-containing adapter inducing interferon β*) e o TRAM (*TRIF-related*

adapter molecule) (4, 6). Ainda, o MyD88 pode se associar ao TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein*), que é outra proteína adaptadora, para induzir a ativação de NF- κ B. A via TRIF também pode atuar via outros fatores de transcrição além do NF- κ B, como os membros da família IRF (*interferon regulatory factor*), nomeados IRF3, 5 e 7, levando a produção de interferon tipo I (IFN- β e IFN- α) (7, 8).

O TLR4 humano foi o primeiro TLR caracterizado em mamíferos (1). O TLR4 funciona como um receptor de transdução de sinal classicamente descrito para LPS, o que foi confirmado em camundongos C3H/HeJ deficientes na sinalização pelo TLR4, os quais não apresentavam respostas ao estímulo por LPS (1). O reconhecimento do LPS pelo TLR4 é complexo, e requer várias moléculas acessórias (9). A resposta inflamatória ao LPS é induzida juntamente com outras proteínas que se ligam a endotoxina como LPS-*binding* (LPB), CD14 e MD-2 (10). O reconhecimento inicia com a ligação de LBP no LPS e termina com a formação do complexo TLR4-MD2-LPS mediando a rápida produção de citocinas e o recrutamento de células para o foco inflamatório (10). Embora LPS seja o ligante mais estudado, o CD14 do complexo pode interagir com outras moléculas como ácido lipoteicóico (1) e ainda, com as citolisinas de bactérias gram-positivas (11) e dipeptídeos de micobactérias (12).

Por outro lado o TLR2 é responsável pelo reconhecimento de vários produtos microbianos, incluindo peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas, paredes celulares de fungos, dentre outros (13). O TLR2 pode exercer sua ação juntamente com outros dois receptores o TLR1 e TLR6. Apesar disso, estes dois últimos são expressos em vários tipos celulares, enquanto que a expressão do TLR2 parece ser restrita a células apresentadoras de antígeno e células endoteliais. Segundo Shishido et al., a ativação de TLR2 tem papel central na regulação da inflamação vascular em

camundongos, sugerindo que o TLR2 induz aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , e IL-6) e de espécies reativas de oxigênio (14).

Além da função dos TLRs na inflamação, essas moléculas têm um papel na indução de células T reguladoras. A sinalização via TLR4 dependente de MyD88 influencia a geração e expansão de células T reguladoras e não a sinalização via TRIF em resposta ao LPS (15). Em adição, a ativação de TLR2 foi correlacionada com uma redução da função das células T reguladoras na Esclerose Múltipla. Os autores mostraram que células T reguladoras de pacientes com Esclerose Múltipla expressavam altos níveis de TLR2 (16). No entanto, a expressão de TLR2 promove a sobrevivência das células T reguladoras (17). Similarmente, flagelina, um ligante de TLR5, aumenta a função supressora e a expressão de FOXP3 pelas células T reguladoras humanas, porém não induz a proliferação das mesmas (18).

Em adição aos TLRs, outros receptores transmembrânicos são dependentes da sinalização via MyD88 nas células do sistema imune: IL-1R e IL-18R. Tais moléculas desempenham um importante papel nas respostas imunes inatas e adquiridas e são receptores para IL-1 β /IL-1 α e IL-18, respectivamente. Além de MyD88, esses receptores podem recrutar outras moléculas adaptadoras similarmente aos TLRs, tais como IRAK, e TRAF as quais levarão a ativação de JNK, p38, NF- κ B e AP-1 (19).

De maneira importante, nos últimos anos todos esses receptores foram descritos como cruciais durante o desenvolvimento da obesidade (20, 21).

1.2 OBESIDADE

A obesidade pode ser descrita como a "Nova Síndrome Mundial", sendo uma condição complexa, afetando indivíduos de todas as idades e grupos socioeconômicos (22). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, no mundo,

atualmente 39% dos adultos acima de 18 anos apresentam sobrepeso e 13% são clinicamente obesos, em números mais exatos, aproximadamente 2 bilhões de adultos no mundo estão com sobrepeso sendo que, mais de meio bilhão são obesos (23).

A morbidade associada inclui, por exemplo, diabetes tipo II, dislipidemias, hipertensão, doença coronariana, entre outras. Além disso, a obesidade é caracterizada por um estado de inflamação crônica moderada, com aumento dos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de fase aguda (24). Tradicionalmente, o tecido adiposo é conhecido como um órgão que armazena o excesso de energia como triglicérides e libera energia como ácido graxo.

Com a descoberta da leptina em 1995, no entanto, o olhar sobre o tecido adiposo mudou consideravelmente: é agora reconhecido como um órgão endócrino que segrega uma grande variedade de hormônios, citocinas, quimiocinas e fatores que influenciam as funções vasculares e endoteliais, o apetite, a saciedade, imunidade, inflamação, o crescimento tumoral, e muitos outros processos fisiológicos (25).

A obesidade é cada vez mais associada à inflamação que é descrita neste contexto como uma inflamação de baixo grau (26) e os mecanismos fisiológicos que conectam a obesidade e a inflamação incluem a produção de uma variedade adipocinas (por exemplo, adiponectina, resistina, visfatina e leptina) e citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6 e IL-1 β pelo tecido adiposo (27, 28). Além disso, elevadas taxas de ácidos graxos livres no soro e no tecido adiposo visceral em humanos obesos, assim como em modelos animais de obesidade, têm sido mostradas para induzir sinalização pró-inflamatória e a resistência à insulina nos tecidos periféricos (29).

O controle da homeostase glicêmica, que acontece principalmente devido à regulação da responsividade à insulina, é outra importante função desempenhada pelos adipócitos. Para isso, o adipócito utiliza inúmeras vias, que se forem capazes de modificar o padrão de translocação do transportador de glicose-4 (GLUT-4) para a membrana plasmática, interferem no processo de captação de glicose e alteram o metabolismo basal destas células (30). Hoje se sabe que inúmeras moléculas são capazes de interferir nesta via, em decorrência da ativação do sistema imune inato, tal como TNF- α LPS bacteriano proveniente da endotoxemia metabólica desencadeada pelo aumento da permeabilidade intestinal em decorrência das alterações da microbiota observadas na obesidade (31, 32).

1.3 RECEPTORES DA IMUNIDADE INATA NO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE EXPERIMENTAL

Modelos experimentais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica estão associados com um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (33, 34) e uma intensa infiltração de macrófagos com perfil pró-inflamatórios (35). O adipócito também apresenta resposta imune inata clássica associada à obesidade iniciada pela ativação de TLR2 e 4, de NF- κ B e aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (36, 37).

TLR4 pode ser ativado por ácidos graxos saturados (38). A ativação da sinalização via TLR4 induz aumento da expressão de vias inflamatórias relacionadas com a indução de resistência à insulina, tais como, c-Jun NH₂ - terminal quinase (JNK) e complexo I κ B quinase (IKK β) (21). Camundongos *knockout* (KO) para TLR4 são protegidos da resistência à insulina induzida pela obesidade, ligantes endógenos

tal como ácidos graxos livres, e LPS, sugerindo um papel importante de TLR4 na interface do sistema imune inato e o metabolismo (21, 39).

Em adipócitos, dois mecanismos diferentes também contribuem para a resistência à insulina induzida por LPS. Ativação de TLR4 por LPS em pré-adipócitos aumenta a expressão de diversas citocinas, principalmente TNF- α e IL-6, prejudicando a sinalização da insulina em adipócitos (40). O LPS, também pode promover a expressão de NF- κ B e ativação de MAPK em adipócitos (41). Além disso, um estudo sugeriu que o LPS pode promover a expressão de iNOS (40), o que também é conhecida como capaz de interferir com a sinalização da insulina (42). O efeito do óxido nítrico (NO) sobre a ação da insulina pode ser agravado pelo aumento da liberação de TNF- α e IL-6 induzida por LPS.

Da mesma forma, o TLR2 foi mostrado como um modulador importante da resistência à insulina. Caricilli et al. mostraram que a inibição a curto prazo de expressão TLR2 usando oligonucleotídeos antisense para TLR2 na dieta levava a um aumento da sensibilidade à insulina e da sinalização da insulina nos camundongos obesos (43). Outros estudos mostraram que camundongos KO para TLR2 apresentam diminuição do peso corporal e da adiposidade e eram protegidos contra a resistência à insulina e ganho de peso (44, 45).

No entanto, em colaboração com outro grupo, encontramos uma descrição metabólica oposta de camundongos TLR2 KO (46). Camundongos TLR2 KO em condições convencionais têm resistência à insulina e intolerância a glicose associada a alterações na composição da microbiota intestinal, que exibiu um aumento na abundância relativa de *Firmicutes* e *Bacteroides* e diminuição da abundância relativa *Proteobactérias*, em comparação com seus controles. A resistência à insulina de camundongos TLR2 KO foi acompanhada por uma diminuída sinalização da insulina. Apesar do fato de que estes camundongos KO e os utilizados em outros

estudos mencionados acima tinham o mesmo fundo genético, eles foram criados em salas diferentes e alimentados com alimentos de diferentes fontes, o que certamente pode ter um papel no estabelecimento e manutenção da sua microbiota intestinal (46). Dessa forma, a microbiota pode subverter uma condição geneticamente determinada anteriormente descrita como sendo de proteção para a obesidade e resistência à insulina em um fenótipo associado a ganho de peso e suas complicações, como a intolerância à glicose e diabetes (46).

Ainda, o TLR5 mostrou-se importante no desenvolvimento da obesidade. De fato, camundongos geneticamente deficientes em TLR5 apresentam alterações metabólicas correlacionadas com mudanças na composição da microbiota intestinal. Estes resultados enfatizam a visão de que a microbiota intestinal contribui para a doença metabólica e sugerem que o mau funcionamento do sistema imune inato pode promover o desenvolvimento da síndrome metabólica (47).

A participação de MyD88 também foi mostrada na obesidade, porém o seu papel é tão complexo que ainda não foi possível entender a sua real participação no desenvolvimento da obesidade. Camundongos nocautes para MyD88 desenvolvem um quadro de diabetes mais severa, e isso foi associado ao aumento *Stearoyl-CoA Desaturase 1* (SCD1), enzima importante na biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados e conhecida como um fator de risco no diabetes (48). No sistema nervoso central, a sinalização via MyD88 é indispensável para o desenvolvimento da obesidade e resistência à leptina (49).

Alterações metabólicas presentes na obesidade já foram associadas com a produção de IL-1 (50). Resultados recentes mostraram diferentes papéis para IL-1 α e IL-1 β na aterosclerose. A formação do ateroma tem sido associada à produção de IL-1 β (51). Ainda, em um modelo de obesidade induzida por dieta, camundongos IL-1R KO desenvolvem obesidade e síndrome metabólica severa comparada a

camundongos selvagens (52). A IL-18, também parece desempenhar um papel importante na síndrome metabólica. Camundongos IL-18 e IL-18R KO desenvolvem síndrome metabólica espontaneamente com a idade, tornaram-se diabéticos e resistentes à insulina (53).

A complexidade do sistema imune nos permite explorar essas vias de sinalização nos diversos órgãos, tecidos e células. Juntos, esses achados sugerem que o sistema imune inato pode determinar a sensibilidade à insulina de um animal, e que moléculas envolvidas nesse complexo sistema podem ter papéis diferentes nesse processo.

1.4 MACRÓFAGOS E DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Além do papel dos receptores da imunidade inata, uma atenção especial tem sido voltada para as células da imunidade inata no desenvolvimento da obesidade.

O remodelamento do tecido adiposo associado à obesidade foi descrito pela primeira vez em 2005 por Cinti e colaboradores pela existência de um significativo número de estruturas em coroa (do inglês *crown-like structures*) que consistem em macrófagos circundando adipócitos mortos em ambos, modelos animais de obesidade e em humanos (35).

A presença dessas estruturas em coroa foi associada à inflamação no tecido adiposo e síndrome metabólica (54). Durante o remodelamento do tecido adiposo que ocorre durante a obesidade, a morte dos adipócitos pode ser suficiente para iniciar uma massiva infiltração de macrófagos e induzir inflamação no tecido adiposo (55).

Hoje, já se sabe que os macrófagos desempenham um importante papel na manutenção da inflamação de baixo grau durante a obesidade (56, 57).

A evolução dos estudos nos permite observar uma complexa rede inflamatória no desenvolvimento da obesidade, bem como a presença de diferentes subtipos de macrófagos.

Em 2007, Lumeng et al. descreveram pela primeira vez o paradigma de macrófagos M1/M2 no tecido adiposo (58). Eles mostraram que além de aumentar em número, o fenótipo dos macrófagos é alterado de um estado anti-inflamatório (M2) para um estado pró-inflamatório (M1) durante a obesidade, o que contribuiu para o baixo grau de inflamação crônica.

Macrófagos podem ser encontrados em ambos os tecidos adiposos, subcutâneo e epididimal, embora o infiltrado seja proeminente no tecido adiposo epididimal.

Macrófagos M1 são induzidos por interferon- γ sozinho ou em conjunto com estímulos microbianos (LPS) ou citocinas, enquanto que M2 são induzidos por IL-4, IL-10, IL-13 e IL-33. No tecido adiposo, macrófagos de perfil M1 tem um papel como células efetoras e indutoras de respostas Th1 polarizadas, e medeiam a resistência contra parasitas intracelulares e tumores, enquanto que a função dos macrófagos M2 geralmente é contribuir para a remodelação do tecido (59), promoção de angiogênese e progressão de tumor (60).

Macrófagos M1 ativados são uma fonte importante de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6, que podem bloquear a ação da insulina em adipócitos via sinalização autócrina/parácrina causando resistência à insulina sistêmica. Assim, tanto o recrutamento e a polarização de macrófagos de perfil M1 são necessários para o desenvolvimento de resistência à insulina (57).

No entanto, o fenótipo dessas células foi mostrado recentemente. Macrófagos M1 e M2 no tecido adiposo são caracterizados pela presença de marcadores específicos, células F480⁺CD11b⁺CD11c⁺ são classificadas como macrófagos M1, enquanto que macrófagos M2 expressam F480⁺CD11b⁺CD206⁺ (58, 61, 62).

1.5 MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Estima-se que a microbiota humana contenha dez vezes mais bactérias do que o número de células humanas presentes (63, 64). Embora haja mais de 50 filos bacterianos descritos até o momento, o trato gastrointestinal humano é dominado por dois filos: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, enquanto *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Cyanobacteria* estão presentes em menores proporções (65).

Atualmente a microbiota tem sido associada ao desenvolvimento da obesidade (2) e além disso, a microbiota intestinal desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema imune e ajuda a manter a homeostase intestinal (2). Tanto em modelos animais, quanto em humanos, alimentação rica em gorduras é capaz de induzir alterações na microbiota e isso foi correlacionado com a gravidade da síndrome metabólica, que possui uma forte influência do sistema imune (66).

Indivíduos obesos têm uma proporção diferencial de dois principais filos da microbiota intestinal. Possuem menos *Bacteroidetes* e mais *Firmicutes*, em comparação com controles magros (67). Essa mudança na abundância relativa dos filos está associada com aumento da capacidade de captação de energia a partir de alimentos.

Outro mecanismo pelo qual a microbiota pode contribuir para alterações metabólicas é desencadeando inflamação sistêmica (68).

A microbiota intestinal desempenha um importante papel no desenvolvimento tanto do sistema imune de mucosa intestinal quanto do sistêmico, o que pode observado em estudos com camundongos livres de micro-organismos. Estes animais apresentam um número anormal de diversos tipos celulares, bem como deficiências em estruturas linfoides locais ou sistêmicas (69) e o perfil de citocinas também é alterado (70). Isso indica que a microbiota é essencial para controlar esses processos e que durante a obesidade, a alteração da microbiota pode levar a alterações no sistema imune.

Trabalhos mostraram que a microbiota intestinal de camundongos obesos pode ser responsável por alterações no estado metabólico, levando a um aumento de LPS sistêmico podendo resultar em resistência à insulina.

A confirmação disso é que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com antibióticos possuem os níveis plasmáticos de LPS em níveis normais, diminuindo a inflamação do tecido adiposo, o estresse oxidativo e melhorando os parâmetros metabólicos do diabetes e da obesidade (32). Desta forma, dietas hiperlipídicas estão associadas com o aumento da absorção de LPS, o que pode estar relacionado com mudanças na flora intestinal. Esse LPS plasmático é conhecido por ativar TLRs desencadeando a inflamação que, posteriormente, levará as alterações metabólicas como obesidade e resistência à insulina.

1.6 PERMEABILIDADE INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Embora a origem molecular do estado de baixo grau de inflamação encontrada em indivíduos obesos seja desconhecida, o LPS foi associado como o responsável pelo aparecimento de doenças metabólicas (21, 39, 71, 72).

Uma questão importante é como a gordura da dieta aumenta a absorção de LPS. Uma explicação seria que o LPS ultrapassaria a barreira intestinal por transporte transcelular por meio de células epiteliais do intestino delgado, o que pode ocorrer através das células M intestinais. Estas células são permeáveis a bactérias e macromoléculas (73).

Também tem sido relatado que TLR é expresso na superfície apical dos enterócitos e é capaz de se ligar e internalizar endotoxina purificada (74). Outro grupo também demonstrou que os enterócitos podem internalizar as bactérias gram-negativas por meio de TLR4, que medeia a fagocitose e a translocação destas bactérias *in vivo* (75).

O LPS, também pode ser internalizado pelas células epiteliais intestinais e transportado para o compartimento de Golgi do enterócito (76). Estudos recentes têm sugerido que a dieta pode desempenhar um papel importante, dado que a absorção de LPS a partir do intestino está associado com a ingestão de gordura na dieta (77). A gordura da dieta leva ao vazamento paracelular do LPS através do epitélio intestinal. Esta opinião é corroborada pela observação de que a integridade intestinal, as *tight-junctions* (78) são prejudicadas em camundongos obesos (79).

Estudos mostraram que TLR2 regula as TJ associadas à integridade da barreira epitelial intestinal e que a deficiência de TLR2 predispõe a alterações das TJs levando a inflamação da mucosa (80). Seguindo esta direção, Caricilli et al. mostraram que os camundongos TLR2 KO apresentam aumento de absorção de LPS após diminuição da expressão das TJs (46).

Na situação em que há um aumento da permeabilidade intestinal e aumento da absorção de LPS, um estado de endotoxemia metabólica é iniciado, caracterizado pela elevada concentração de LPS no soro. A origem da endotoxemia metabólica ainda não é clara, mas as evidências mostram que pode estar associada a alterações

na microbiota intestinal, levando a um aumento da ativação de vias inflamatórias e do comprometimento da sinalização da insulina.

1.7 LÂMINA PRÓPRIA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

A participação das células da lâmina própria no desenvolvimento da obesidade ainda precisa ser melhor esclarecida. Sabe-se que estas células contribuem para a homeostase intestinal através do reconhecimento bactérias comensais e produção de citocinas anti-inflamatórias. Alguns estudos com modelos de colite em camundongos MyD88 KO e MyD88 KO apenas nas células do epitélio intestinal (MyD88(Δ IEC)), demonstraram que esses camundongos não são capazes de montar uma resposta inflamatória, o que estaria agravando o quadro da doença que é desencadeada no intestino grosso (81, 82). Nesses trabalhos os autores concluem que a expressão de MyD88 no epitélio intestinal é importante para manter a homeostasia.

Fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos e células dendríticas (DCs), são as principais células envolvidas na manutenção da integridade do tecido, bem como na iniciação e controle da resposta imune inata e adaptativa, as quais são imprescindíveis (83) para a tolerância a antígenos alimentares, micro-organismos comensais e agentes patogênicos na mucosa intestinal. A desregulação desse equilíbrio resulta em um desbalanço na homeostase intestinal (84). Estes fagócitos são distribuídos nos órgãos linfóides, tais como placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (MLNs), e também são muito abundantes na lâmina própria intestinal (85), mas a classificação fenotípica destas células ainda não é totalmente conhecida.

Hoje, parece haver um consenso de que células CD11c⁺CD103⁺MHC II⁺ são as DCs “boas” da lâmina própria (86), no entanto, a controvérsia permanece sobre a

linhagem de células que expressam CX₃CR₁, se são DCs ou macrófagos, porque muitos grupos ainda se referem a elas como DCs, outros como fagócitos mononucleares, e ainda outros, como macrófagos (87).

Cada vez mais tem se descrito que numerosos subconjuntos de DCs e macrófagos existem na lâmina própria intestinal (87, 88). As DCs CD103⁺CX₃CR₁⁻CD11b⁻ (89) parecem ser a principal, se não a única população de DCs, que migra para os MLNs através de um mecanismo CCR7-dependente e são importantes para a indução de tolerância oral, bem como para a supressão da colite por células T reguladoras (T regFoxp3⁺) (85, 89-92). Estas DCs foram descritas por ter a capacidade de gerar e ativar células T CD8⁺. Além disso, são capazes de induzir a geração periférica de células T regFoxp3⁺ (93). Também, as DCs CD103⁺ têm a capacidade de produzir TGF- β (92). Kinnebrew et al. mostraram que as DCs da lâmina própria CD103⁺CD11b⁺ promovem tolerância contra antígenos alimentares e também rapidamente produzem IL-23 em resposta a flagelina na lâmina própria (94).

Macrófagos CX₃CR₁⁺ contribuem para a homeostase intestinal através da produção de citocinas anti-inflamatórias e reconhecimento das bactérias comensais que ultrapassam a barreira epitelial (95). Estas células também parecem desempenhar um importante papel no processo de indução de tolerância oral, expandindo células T reg Foxp3⁺ (96).

Medina-Contreras et al. (97) demonstraram um importante papel para o CX₃CR₁ em manter populações de macrófagos da lâmina própria, impedindo a translocação de bactérias comensais para os MLNs limitando respostas Th17 na colite. Camundongos KO para CX₃CR₁ tiveram reduzida frequência de macrófagos da lâmina própria e estes KO exibiram acentuadamente maior translocação de

bactérias comensais para MLNs. Além disso, a gravidade da colite induzida por DSS foi drasticamente aumentada nos KOs em comparação com os controles.

Ainda, células de Paneth secretam alfa defensinas tais como DEFCR-1 no intestino, bem como outros agentes antimicrobianos tais como REG III na camada mucosa (98). Estas células protegem todo o epitélio intestinal de infecções microbianas e regulam a colonização bacteriana do intestino (98). Alfa defensinas são os produtos mais abundantes secretados pelas células de Paneth (99) e os principais indutores são os produtos de degradação das bactérias do intestino. A sua presença na camada mucosa do epitélio intestinal é constantemente monitorada pelos receptores de reconhecimento de padrões moleculares que são expressos em células de Paneth e enterócitos como TLRs e NLRs (100). As alfa defensinas geram uma resposta anti-inflamatória moderada no intestino suprimindo IL-1 β em resposta ao LPS bacteriano (101). Além desta resposta anti-inflamatória que é benéfica, os microrganismos são capazes de bloquear a expressão de alfa defensinas entéricas e outras substâncias antimicrobianas pelas células de Paneth usando mecanismos ainda desconhecidos, podendo então causar inflamação.

Recentemente, tem sido mostrado que a microbiota intestinal proporciona estímulos essenciais e sinais necessários para a indução de peptídeos antimicrobianos (102).

O peptídeo antimicrobiano REGIII parece ser alterado em camundongos nocautes para os receptores intracelulares NOD-1 e NOD-2, no entanto, não é claro se um componente específico da microbiota intestinal regula a expressão de proteínas REG III pelas células intestinais (103). Estudos relataram que camundongos transgênicos para MyD88 no intestino reduziu a expressão de peptídeos antimicrobianos no intestino delgado e aumento da translocação bacteriana para os MLNs. A sinalização via MyD88 pode fornecer sinais diretos e

indiretos para aumentar a produção de fatores antimicrobianos que segregam a microbiota dos tecidos do hospedeiro (103).

Além das células da lâmina própria, a deleção de MyD88 em células não hematopoiéticas, tal como células epiteliais intestinais, resulta em imunidade comprometida a infecções bacterianas, o que implica a estas células mediar o reconhecimento de bactérias, o que é um processo chave para o desenvolvimento de respostas imunes protetoras no trato gastrointestinal (104).

No entanto, o reconhecimento de bactérias comensais por células epiteliais e também por células hematopoiéticas é essencial para manter a homeostase intestinal. Nas células do epitélio intestinal, o reconhecimento das bactérias comensais deve ocorrer sem iniciar uma resposta imune, o que sugere que os receptores da imunidade inata não são os únicos responsáveis por discriminar comensais de patogênicos. Também, os micro-organismos comensais são capazes de modular a sinalização nas células do epitélio intestinal. Por exemplo, embora as bactérias patogênicas induzam a ativação de NF- κ B via TLRs *in vitro*, estudos demonstraram que as bactérias comensais, tais como *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.* e algumas espécies de *Escherichia coli* podem inibir esta via (105).

Todos esses dados nos remetem o papel do sistema imunológico em controlar alterações metabólicas por si só, ou levando a alterações na microbiota intestinal. Por outro lado, alterações da microbiota intestinal também podem controlar a homeostase do sistema imune e o desenvolvimento da síndrome metabólica.

Atualmente, as atenções estão voltadas para o estudo da interação do sistema imune com o desenvolvimento das doenças metabólicas. Visto que a obesidade é uma epidemia global crescente, é de extrema importância que possamos colaborar para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento destas

doenças. A imunidade inata é a nossa primeira linha de defesa, e foi nela que decidimos focar.

MyD88 é uma molécula de sinalização essencial para a maioria dos TLRs e é essencial para a indução de citocinas pró-inflamatórias (106, 107). Além disso, acreditamos que a sinalização via MyD88 no intestino poderia participar através da modulação da microbiota, que consequentemente influenciaria o processo via alça de *feedback* na sinalização via MyD88 no intestino. Ademais, considerando que é evidente a partir de modelos de obesidade que adipócitos e macrófagos localizados no tecido adiposo produzem mediadores pró-inflamatórios, os *links* entre a inflamação, recrutamento e ativação de macrófagos necessitam ser melhor compreendidos, em especial pela participação na regulação do metabolismo que vem sendo atribuída a TLRs. Desta forma, neste trabalho, nós formulamos a hipótese de que a sinalização via MyD88 regularia o desenvolvimento da obesidade, desempenhando um papel importante nos processos metabólicos, como o desenvolvido de resistência à insulina, via modulação do processo inflamatório, em especial em macrófagos e via alterações na interface microbiota-intestino, com impactos na geração de uma resposta inflamatória local e sistêmica.

2.1 GERAL

Assim, nosso objetivo foi estudar a relação entre a obesidade e inflamação, focando no papel da molécula adaptadora MyD88 e sua importância no desencadeamento de alterações metabólicas e inflamatórias no tecido adiposo, nos macrófagos e no intestino.

2.2 ESPECÍFICOS

Em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos MyD88 KO e C57BL/6 selvagens, objetivamos:

- Avaliar o perfil metabólico;
- Verificar os níveis de inflamação sistêmica, no tecido adiposo, intestino e fígado;
- Caracterizar o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo e no fígado;
- Avaliar a permeabilidade intestinal;
- Verificar o infiltrado de macrófagos residentes, células dendríticas e células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺; e
- Verificar as alterações e na microbiota intestinal e suas consequências funcionais.

Finalmente, em modelos deleção gênica numa população celular específica, utilizando camundongos *Lisozima*^{cre+}*MyD88*^{flox +/+} e *Adiponectina*^{cre+} *MyD88*^{flox +/+}, pretendemos:

- Verificar o desenvolvimento da obesidade e os parâmetros metabólicos;
- Caracterizar o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo; e
- Avaliar a permeabilidade intestinal e a inflamação intestinal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos, com idade entre 4 a 8 semanas, pesando de 20 a 25 g todos da linhagem C57BL/6, MyD88 *knockouts* (KO) e animais normais C57BL/6. Ainda, camundongos *Adiponectina^{cre+}MyD88^{flox+/+}* e *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}* foram utilizados neste estudo. Protocolo registrado sob o nº 133 na folha 110 do livro 02 e protocolo registrado sob o nº 122 na folha 134 do livro 02.

Os animais C57BL/6 e MyD88 KO foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo e CEDEME da Universidade Federal de São Paulo. Os camundongos do sistema cre-lox MyD88^{flox+/+} (nº 008888; B6.129P2(SJL)-Myd88^{tm1Defr/J}) foram adquiridos na “The Jackson Laboratory” e os camundongos *Adiponectina^{cre+}* (nº 010803; B6.FVB-Tg ^(Adipoq-cre)1Evdr/J) e *Lisozima^{cre+}* (nº 004781; B6.129P2-Lyz2^{tm1(cre)Ifc/J}) para podermos gerar os camundongos *Adiponectina^{cre+}MyD88^{flox+/+}* e *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}* foram cedidos pelo professor Willian Festuccia do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo. Os animais foram cruzados e genotipados em nosso biotério. Durante a dieta, os animais foram acondicionados em microisoladores coletivos, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22 °C e com suprimentos de água e alimento irradiado disponíveis todo o tempo.

Para os estudos com camundongos MyD88 KO, foram utilizados como controles os camundongos WT provenientes do mesmo biotério e pareados para idade e sexo.

Já nos experimentos com os camundongos *Adiponectina^{cre+}MyD88^{flox+/+}*, foram utilizados como controles os camundongos *Adiponectina^{cre-}MyD88^{flox+/+}*. Para

os experimentos utilizando camundongos *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}*, foram utilizados como controles os camundongos *Lisozima^{cre-}MyD88^{flox+/+}*. Para todos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica irradiada, o mesmo número de camundongos foi alimentado com dieta padrão irradiada. Todos os camundongos utilizados nesses experimentos foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo e acondicionados e microisoladores em nosso biotério até o final do experimento.

Para os estudos de transferência de microbiota, após tratamento com antibióticos, foram utilizados receptores WT alimentados com dieta padrão irradiada. Esses camundongos foram transplantados com um pool de conteúdo cecal de camundongos MyD88 KO alimentados com dieta padrão irradiada ou de camundongos WT alimentados com a mesma dieta como controle do experimento. Uma semana após a transferência de microbiota, ambos os grupos foram alimentados com dieta hiperlipídica irradiada ou dieta padrão irradiada. Todos os camundongos incluídos no estudo de transferência de microbiota foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade Federal de São Paulo, acondicionados em microisoladores em nosso biotério por 2 semanas que antecederam o início do tratamento com antibióticos e mantidos no mesmo biotério até o final do experimento, para assegurar que as alterações da microbiota não sofressem interferências externas.

3.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE

A obesidade foi induzida por dieta hiperlipídica (Rodent Diet com 45% kcal de gordura, 20% kcal de proteína e 35% kcal de carboidrato, Research Diets, Inc) irradiada. Os camundongos foram alimentados durante 12 semanas a partir da 8^a

semana de vida. A dieta comum utilizada como controle contém 70g/Kg de gordura, 70g/Kg de fibras e 22.5g/Kg de proteínas. O peso dos camundongos e a ingestão alimentar foram monitorados constantemente.

3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E TOLERÂNCIA À INSULINA

A resposta periférica à glicose foi avaliada pelo teste de tolerância à glicose (GTT). A glicose (1,5 mg/g peso corporal) é administrada por via intraperitoneal em camundongos com jejum de 12 horas, e os níveis de glicose no sangue foram determinados antes e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da administração de glicose. A resposta à insulina foi analisada após jejum de 6 horas e injeção de 0,8 U/kg de camundongos e os níveis de glicose no sangue foram determinados antes e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da administração de insulina. Todos os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais. Foi utilizado ACCU-CHEK®Advantage II – (Roche Mannheim, Alemanha) para a leitura dos níveis de glicose.

3.4 CAPTAÇÃO DE GLICOSE E CONVERSÃO PARA SEUS METABÓLITOS *in vitro*

Nos experimentos para estudo do metabolismo celular *ex vitro*, optamos por utilizar fragmentos de tecido adiposo em vez de adipócitos isolados, para evitar estresse metabólico associado com a digestão com collagenase e para preservar o microambiente. A interpretação dos dados deve, portanto, levar em conta a possibilidade de que outras populações de células que compõem o tecido adiposo além de adipócitos maduros podem ter contribuído para os efeitos observados. Resumidamente, os fragmentos de tecido adiposo (20-25 mg) epididimal foram incubados em 1 ml de tampão bicarbonato de Krebs -Ringer (mmol/ l) : 118 NaCl, 4,8

KCl, 1,25 CaCl₂, 1,2 de KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 25 de NaHCO₃, e 5,5 [U-14C] glicose (0,5 mCi/ tubo, 3 mCi/ mmol; Amersham) suplementado com 2,5% de BSA livre de ácido graxo (Sigma - Aldrich, Oakville, ON, Canadá), pH 7,4. Os frascos foram fechados com tampa de borracha, gaseificados com 5% de CO₂ e 95% de O₂, e incubados a 37 °C durante 1h na presença ou ausência de insulina (100 pmol/l). No final da incubação, as reações foram paradas com H₂SO₄, e hidróxido de benzetônio foi injetado com uma seringa e agulha em uma tira de papel previamente posicionada na rolha de borracha para prender CO₂. Os fragmentos foram removidos e destinados para a extração de lipídeos e hidrólise de TAG. Após, as amostras foram lidas em contador de radioatividade beta. Os valores são fornecidos em DPM (do inglês *disintegrations per minute*) e normalizados pelo peso dos tecidos.

3.5 AVALIAÇÃO DE GORDURA CORPORAL

Camundongos magros e obesos foram utilizados para a imageologia de um sistema de imagem Carestream In-Vivo MS FX PRO multi-espectral. Imagens de raios-X foram levados a diferentes níveis de energia: um raio-X de baixa energia que faz a imagem de tecidos moles (gordura) e um raio-X de alta energia que faz imagens do tecido ósseo. As imagens são automaticamente corrigidas para iluminação e a densidade dos tecidos de cada camundongo obtida. A sobreposição das fotos com diferentes níveis de energia nos possibilita demonstrar a massa gorda, magra e óssea. O cálculo realizado para obter a porcentagem de gordura total está descrito abaixo:

$$\% \text{ de gordura} = \frac{(\text{Área}[\text{gordura} + \text{massa magra} + \text{massa óssea}] - \text{área}[\text{massa magra} + \text{massa óssea}]) \times 100}{\text{Área}[\text{gordura} + \text{massa magra} + \text{massa óssea}]}$$

O experimento e as análises foram realizados no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) da Universidade de São Paulo.

3.6 CONSUMO DE OXIGÊNIO/PRODUÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO E DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DE TROCA RESPIRATÓRIA (RER)

Consumo de oxigênio/produção de dióxido de carbono, razão de troca respiratória (RER) e atividade foram medidos em animais alimentados através de um calorímetro indireto de circuito aberto (Sistema Oxymax luxo; Columbus Instruments, Columbus, Ohio). O consumo de oxigênio foi medido após um período de adaptação de 24 horas em caixas metabólicas. Os animais permaneceram em repouso 24 horas em gaiolas individuais específicas para medidas metabólicas de pequenos animais em repouso. O sistema foi previamente calibrado com uma mistura de gases: 20,5% de oxigênio e 0,5% de gás carbônico. Foram medidos simultaneamente: o consumo de oxigênio ($\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), a produção de dióxido de carbono ($\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e o índice de trocas respiratórias (RER) e atividade (movimentação).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE INSULINA, ADIPONECTINA E LEPTINA NO SORO

Soro livre de hemólise foi gerado por centrifugação. A insulina, leptina e adiponectina foram analisados por kits ELISA da Millipore (Billerica, MA, USA) e R&D (Minneapolis, MN, USA), respectivamente. As amostras foram quantificadas em duplicatas. O soro para dosagem de insulina foi coletado após jejum de 12 horas e após 30 e 90 minutos da injeção de 2g/kg de glicose. Para as dosagens de leptina e adiponectina, o soro foi coletado por punção cardíaca no momento da eutanásia.

Ambos os testes foram realizados conforme recomendações dos fabricantes. Para as dosagens de adiponectina, as amostras foram diluídas 1:20000, a sensibilidade do kit é 0,007 ng/mL. Para as dosagens de leptina, as amostras foram diluídas 1:20, a sensibilidade do kit é 22 pg/mL. Para as dosagens de insulina utilizamos 10 microlitros de soro sem diluir, a sensibilidade do kit é 0,2 ng/mL.

3.8 DETERMINAÇÃO DE LPS NO SORO

Concentração de LPS no soro foi determinada usando um ensaio cromogênico baseado em um extrato de amebócitos de *Limulus* (kit de LAL terminal-QCL1000) (LONZA, Basel, Switzerland). As amostras foram coletadas no momento da eutanásia através de punção cardíaca para tentar minimizar o máximo possível a chance de contaminações. O teste é quantitativo para endotoxina bacteriana gram-negativa e foi realizado conforme orientações do fabricante. Utilizamos 50 microlitros de amostra em duplicatas. A sensibilidade do kit é 0,1 unidades de endotoxina/mL.

3.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Fragments intestinais foram fixados em solução formaldeído tamponado 4% (pH=7,0), emblocados em parafina e submetidos a banhos seriados de xilol e álcool. Cortes histológicos foram realizados e as amostras foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a tampão citrato a temperatura de 96 °C para recuperação antigênica. A atividade de peroxidase endógeno foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (3%) e solução de bloqueio de proteína (DAKO, Glostrup, Denmark) foi adicionada. Anticorpos primários (diluição 1:100) para ZO-1 ou controle negativo foram incubados em câmara escura umidificada a 4 °C *overnight*, seguido por uma

incubação com um polímero marcado (Dual Link System-HRP, DAKO, Glostrup, Denmark), usando duas incubações de 30 minutos a temperatura ambiente. A marcação com substrato cromógeno 3,3'-O-diaminobenzidina (DAB) foi realizada por incubação de 1-3 minutos a temperatura ambiente (cor marrom) seguida por uma contra-coloração com hematoxilina. A análise da marcação positiva para estas moléculas foi realizada de ao menos 20 fotos por tecido usando o programa de análise de imagens Image J (KS300, ZeissSystem, Oberkochen, Germany).

3.10 DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL PELA ANÁLISE DE FITC-DEXTRAN

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela administração por gavagem de FITC dextran (DX-4000-FITC) (SIGMA, St. Louis, MO, USA), uma macromolécula não metabolizada que é utilizada como uma sonda de permeabilidade. Após 3 meses de dieta hiperlipídica, 5 camundongos de cada grupo foram tratados através de gavagem com FITC-dextran (250 mg/Kg) após 4 horas de jejum. Após 6 horas o sangue foi coletado pela cauda. Diluições de FITC-dextran em PBS foram usadas como uma curva padrão (0, 1,25, 2,50, 5,0, 10, 20, 40, 60, 80 µg/ml), e absorção de 100 µL de soro ou de padrão foi medida em um fluorímetro com excitação a 485 nm e a leitura em 535 nm. O soro de um camundongo sem administração de FITC-dextran foi utilizado como negativo.

3.11 DOSAGEM DE TRIGLICERÍDEOS E COLESTEROL

Os camundongos foram mantidos em jejum por 12 horas e o sangue foi coletado pela cauda. Soro livre de hemólise foi gerado após centrifugação. O

colesterol foi analisado por teste enzimático colorimétrico BIOCLIN (Colesterol Monoreagente Ko83, BIOCLIN, Belo Horizonte, MG, Brasil) e os triglicerídeos pelo teste colorimétrico (Triglicérides liqueform, LABTEST, MG, Brasil) conforme orientações dos fabricantes.

3.12 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL (SEQUENCIAMENTO)

Amostras de fezes foram coletadas em gaiolas metabólicas, congeladas em nitrogênio líquido e mantido a -80 °C até o uso. O DNA foi então extraído utilizando o QIAamp DNA Mini StoolKit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e quantificado. As bibliotecas foram sintetizado a partir de 500 ng de DNA total seguindo as instruções da Rapid Library Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Estas bibliotecas foram analisadas num Bioanalyzer com um Kit de DNA de alta sensibilidade (Agilent Technologies Inc., CA, EUA) 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 sequenciadas no GS FLX Titanium, utilizando um GS FLX Titanium Kit PicoTiterPlate combinado com um GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70 (Roche Applied Science). Os dados obtidos a partir do sequenciamento foram submetidos ao servidor do MG-RAST e comparados por filo prevalência entre grupos.

3.13 PURIFICAÇÃO DA SUBPOPULAÇÃO DE CÉLULAS INFILTRANTES NO TECIDO ADIPOSEO, FÍGADO E INTESTINO E AVALIAÇÃO DOS FENÓTIPOS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a purificação das células do tecido adiposo, o tecido adiposo foi incubado com colagenase do tipo II (10µg/mL; Sigma-Aldrich) em PBS com EDTA (2 mM; Sigma-Aldrich) por 30 minutos à 37 °C. A suspensão do tecido adiposo foi filtrada utilizando um *cell strainer* de 100 µm. A solução foi submetida a gradiente de percoll para a purificação dos leucócitos. O fígado foi digerido em colagenase do tipo IV (2mg/mL; Sigma-Aldrich) em PBS com EDTA (2 mM) por 30 minutos à 37 °C. A suspensão do tecido foi filtrada utilizando um cell strainer de 100 µm. A solução foi submetida a gradiente de percoll para a purificação dos leucócitos.

Para a purificação das células da lâmina própria, o intestino foi incubado com EDTA (5 mM) para remover os linfócitos intra-epiteliais, após 30 minutos de incubação a 37 °C, o tecido foi filtrado e lavado com meio de cultura contendo EDTA (2mM). Após, o tecido foi digerido em meio de cultura contendo Liberase (1:250 de uma solução a 25mg/ml, ROCHE, Basel, Suíça) DNASE (0,5 µg/mL, Sigma-Aldrich) e DTT (ROCHE, Basel, Suíça), após a suspensão do tecido foi filtrada utilizando um cell strainer de 100 µm e 40 µm. A solução foi submetida a gradiente de percoll para a purificação dos leucócitos. Após o gradiente de percoll, as células foram lavadas com PBS e marcadas com o painel de anticorpos anti-CD11b, F4/80, CD11c, CD206, CX3CR1, CD103 diluídos 1:100 (Biolegend, CA, USA). A caracterização das subpopulações de leucócitos nos grupos através da imunomarcação foi realizada no aparelho FACS CANTOII (BD, Beckton Dickson, NJ, USA) e as análises dos dados foi feita no *software FlowJo*.

3.14 BIOPLEX

O soro dos animais foi utilizado para realização do *BioPlex mice Plex cytokine assay kit* (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) para a detecção de citocinas

simultaneamente. A leitura do ensaio foi realizada no *BioPlex suspension array system* e os dados foram analisados usando software *BioPlex Manager version 4.0*. O procedimento foi realizado conforme as instruções do fabricante. As curvas-padrão abrangeram a detecção entre 32.000 a 1,95 pg/mL.

3.15 WESTERN BLOTTING

Aproximadamente 50 µg de proteína total, obtido do tecido adiposo epididimal e do intestino, foram diluídos em tampão de amostra (Biorad, EUA), contendo 20 mg/ml de 2-β-mercaptoetanol (Sigma). A seguir, as proteínas foram desnaturadas por aquecimento de 5 minutos a 95 °C e foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, sendo esta bloqueada durante 1 hora com leite 5% dissolvido em TBS-T e, a seguir, incubada com o anticorpo primário diluído em TBS. A seguir, a membrana foi lavada com TBS e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário biotinilado. A massa molecular das proteínas foi determinada por comparação com a migração das proteínas padrão Rainbow ou Dual-Color (BioRad Laboratories, CA, EUA). Os anticorpos primários utilizados foram *mouse* p-JNK, *mouse* p-IκB-α, p-AKT 473, p-AKT 308, AKT total, p-ERK, claudina-1, ocludina (1:1000 Cell Signaling Technology, MA, USA) e β-actina (Sigma-Aldrich, 1:10000).

3.16 EXTRAÇÃO DE RNA E PREPARAÇÃO DO cDNA

Para as amostras de tecido adiposo epididimal e subcutâneo, fígado e fragmentos de intestino submetidas à extração do RNA foi utilizado o reagente TRizol® (Life

Technologies, CA, USA). A preparação do DNA complementar (cDNA) foi realizada usando-se 2 µg RNA, 0,8 µL de transcriptase reversa M-MuLV, 4 µL de 5 X Reaction Buffer para M-MuLV, 2 µL de dNTPs 10 mM, 32 U/µL de RiboLock™ RibonucleaseInhibitor (todos da Fermentas, Hanover, MD, USA) e 320 ng de primer oligo-dT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Esta mistura foi incubada a 42 °C, por 60 minutos, e em seguida a 70 °C, por 10 minutos. O cDNA foi acondicionado em -20 °C.

3.17 PCR EM TEMPO REAL

Após a preparação do DNA complementar (cDNA), foi realizada a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real. As condições de amplificação foram padronizadas para cada transcrito. Uma relação comparativa entre os ciclos da reação (CT) foi usada para determinar a expressão gênica em relação ao controle HPRT (*gene housekeeping*). A detecção dos genes de interesse foi realizada com Taqman no aparelho ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems), utilizando primers e sondas comercialmente disponíveis (Life Technologies) para os seguintes genes: IL-1β (Mm01336189_m1), IL-6 (Mm_00561420_m1), TNF-α (Mm_00443258_m1) e HPRT (Mm03024075_m1). Os genes a seguir tiveram suas detecções realizadas com SybrGreen® (Life Technologies) com as seguintes sequências de pares de primers: REGIII-γ sense: TTCCTGTCCTCCATGATCAAAA e anti sense: CATCCACCTCTGTTGGGTTCA, DEFCR-1 sense: CAGGCCGTATCTGTCTCCTT e anti sense: ATGACCCTTTCTGCAGGTTC, CX3CR1 sense: GGAGACTGGAGCCAACAGAG e anti sense: CCTGATCCAGGGAATGCTAA, ZO-1 sense: AGGACACCAAAGCATGTGAG e anti sense: GGCATTCCTGCTGGTTACA. O método de quantificação foi o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (108).

3.18 CBA (*CYTOMETRIC BEAD ARRAY*)

O kit de CBA *Mouse Cytokine Assay* (BD Bioscience) foi utilizado para quantificar TNF- α e IL-6 no tecido adiposo epididimal e no soro. O ensaio foi realizado conforme orientações do fabricante e as amostras foram adquiridas no aparelho FACS CANTO II (BD Biosciences) e analisadas utilizando *FCAP Array software* (BD Biosciences).

3.19 CULTURA DE EXPLANTE DE INTESTINO

Fragmentos de 1 centímetro do intestino grosso e intestino delgado foram coletados no momento da eutanásia e mantidos durante 24 horas em 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% SBF, 1% penicilina e 1% streptomicina. Após 24 horas o meio de cultura foi coletado para subseqüentes análises de secreção de citocinas.

3.20 PROTOCOLO DE DEPLEÇÃO E TRANSFERÊNCIA DA MICROBIOTA

Um pool de conteúdo cecal proveniente de 3 camundongos WT e 3 camundongos MyD88 KO foi preparado com PBS estéril e 150 microlitros dessa mistura foi administrada através de gavagem em camundongos WT após 3 semanas de tratamento com antibióticos. Os antibióticos (ampicilina (Bristol Meyers Squibb, New York City, NY) 1 g/l; vancomicina (Abbot, Abbot Park, IL) 5 mg/ml; neomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) 10 mg/ml e metronidazol (Actavis, Hafnarfjörður, Iceland) 10 mg/ml) foram administrados na água dos animais e também foram administrados por gavagem um dia sim, outro não. O tratamento com antibiótico

iniciou na 4ª semana de vida dos camundongos, o transplante de microbiota ocorreu na 7ª semana de vida e a dieta hiperlipídica iniciou quando os camundongos completaram 8 semanas, uma semana após o transplante de microbiota.

3.21 INDUÇÃO DA SEPSE POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP)

Para indução da septicemia, o ceco dos animais foi perfurado (2 vezes) com agulha 23 gauge, seguido de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Após a perfuração do ceco, o intestino é recolocado na cavidade abdominal a musculatura e a pele suturadas. O fechamento da cavidade é feito com pontos cirúrgicos contínuos em dois planos (aponeurose e pele) com fios DACRON 4-0 (Alcon, Forth Worth, EUA). Após a sutura, os animais foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (60 a 120 minutos). A seguir, foram mantidos um camundongo por gaiola até o sacrifício.

3.22 CONTAGEM DE BACTÉRIAS NA CAVIDADE PERITONEAL

Cultura bacteriana quantitativa foi realizada no lavado peritoneal para obter unidades formadoras de colônias (CFU) dos camundongos controles e 24 horas após a sepsse por CLP. As CFU foram determinadas após diluição seriada até 1×10^6 e inoculados 50 microlitros em meio de cultura ágar e incubação em estufa a 37 °C por 18h. Os dados são demonstrados com o número de CFU $\times 10^6$ /mL.

3.23 GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS

Os camundongos *Adiponectina*^{cre+}, *MyD88*^{flox+/+}, *Lisozima*^{cre+} foram cruzados durante 3 gerações até obtermos os camundongos *Adiponectina*^{cre+} *MyD88*^{flox+/+} e *Lisozima*^{cre+} *MyD88*^{flox+/+}. Primeiramente, camundongos^{cre+} foram cruzados com camundongos^{Flox+/+} (F1) para obtermos camundongos^{Cre+/-Flox+/-}. Após, camundongos^{cre+/-Flox+/-} foram cruzados com camundongos^{Cre+/-Flox+/-} (F2) para obtermos camundongos^{Cre+/+Flox+/+}. Para expandirmos o número de animais, camundongos^{Cre+/+Flox+/+} foram cruzados com camundongos^{Cre-/-Flox+/+} (F3) para obtermos camundongos^{Cre-/-Flox+/+} e camundongos^{Cre-/-Flox+/+}.

Antes de usarmos nos experimentos, todos os camundongos foram genotipados por PCR, utilizando DNA isolado de um pequeno pedaço da cauda. Nos camundongos *Adiponectina*^{cre+} somente é possível identificar se são Cre+ ou Cre- (sense ACG GAC AGA AGC ATT TTC CA; anti sense GGA TGT GCC ATG TGA GTC TG) transgene = 200bp (Anexo V). Nos camundongos *MyD88*^{flox} é possível identificar homozigose+/+ e heterozigose+/- (sense GTT GTG TGT GTC CGA CCG T; anti sense GTC AGA AAC AAC CAC CAC CAT GC) mutante= 353 bp, heterozigose= 266 bp e 353 bp, selvagem= 266 bp (Anexo V). Já nos camundongos *Lisozima*^{cre}, é possível identificar se eles são homozigotos ou não, utilizando primers para identificar a mutação e o selvagem (mutante CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG; comum CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC; selvagem TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC) Mutante =700 bp, heterozigose= 700 bp e 350 bp, selvagem = 350 bp (Anexo V).

3.24 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados em gráficos, mostrando média e desvio padrão (DP) ou medianas e variações. Os testes t, “Mann-Whitney” e ANOVA *on ranks* foram usados para comparar os dados. Os resultados dos PCR foram apresentados

na razão entre o gene calibrador HPRT, apresentados em unidades arbitrárias (UA). O teste de Long-rank foi usado para análise da curva de sobrevida. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com valor de p menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO DOS CAMUNDONGOS SOB DIETA HIPERLIPÍDICA

Com o intuito de mostrar o papel da molécula adaptadora MyD88 no desenvolvimento da obesidade, primeiramente, submetemos camundongos WT e MyD88 KO à dieta hiperlipídica durante 90 dias.

Pelo fato de que a ativação do sistema imune inato estar envolvido no desenvolvimento da obesidade, esperávamos que camundongos MyD88 KO ganhassem menos peso, já que ela é a molécula adaptadora da grande maioria dos TLRs, e que a inflamação resultante da ativação desta via havia sido associada a obesidade (109).

Iniciamos os estudos avaliando o ganho de peso dos camundongos WT e MyD88 KO e para nossa surpresa, estes camundongos ganharam mais peso em relação aos camundongos WT (Figura 1 A e B), e este dado foi confirmando com avaliação do índice de gordura corporal (Figura 2 A e C) que mostra um aumento significativo da porcentagem de gordura corporal.

Corroborando os resultados descritos acima, a análise dos cortes histológicos do tecido adiposo epididimal indicou maior hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos (Figura 2 B).

Os pesos do tecido adiposo subcutâneo, mesentérico e epididimal também foram analisados e medidos, e observamos um aumento significativo nos pesos de todos os tecidos obtidos dos camundongos MyD88 KO (Figura 3 A, B e C) ao final da dieta.

Além disso, analisamos o consumo de oxigênio de ambos os grupos e observamos que camundongos MyD88 KO obesos apresentaram diminuição do

consumo de oxigênio comparados aos camundongos WT (Figura 4 A), sugerindo diminuição do gasto de energia.

A deficiência de MyD88 em camundongos obesos resultou em uma diminuição da razão de troca respiratória (RER) (Figura 4 B), sugerindo um aumento na oxidação de ácidos graxos. Ainda, camundongos MyD88 KO obesos apresentaram atividade diurna e noturna diminuída (Figura 5 A e B). Os níveis de colesterol total e triglicerídeos também estavam aumentados (dados não mostrados).

Figura 1 - Análise do ganho de peso dos camundongos MyD88 KO. O peso dos camundongos foi mensurado duas vezes por semana durante 3 meses. (A) Média do ganho de peso entre os grupos durante o período da dieta. (B) Análise final do ganho de peso após 90 dias de dieta. DIO= obesidade induzida por dieta; (g)=gramas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 6 animais por grupo.

Figura 2 - Análise do índice de gordura corporal dos camundongos MyD88 KO. (A) Camundongos magros e obesos foram utilizados para a imageologia em um sistema de imagem

Carestream In-Vivo MS FX PRO multi-espectral. (B) Histologia do tecido adiposo após três meses de dieta. (C) Quantificação da porcentagem de gordura corporal mensurada na figura A. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

Figura 3 - Análise do peso dos tecidos adiposos dos camundongos MyD88 KO. Após 3 meses de dieta hiperlipídica os tecidos adiposos foram coletados e pesados. (A) Tecido adiposo epididimal. (B) Tecido adiposo subcutâneo. (C) Tecido adiposo mesentérico. Mag= magro; DIO= obesidade induzida por dieta; (g)=gramas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 6-8 animais por grupo.

Figura 4 - Consumo de oxigênio/produção de dióxido de carbono e determinação da relação de troca respiratória (RER) dos camundongos MyD88 KO. Esses parâmetros foram medidos nos animais através de um calorímetro indireto de circuito aberto. Os animais foram alimentados durante todo o processo. (A) Medida de VO2. (B) Razão VO2/VCO2 (RER). DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

Figura 5 - Atividade diária e noturna dos camundongos MyD88 KO. A atividade foi medida nos animais através de um calorímetro indireto de circuito aberto. (A) Atividade diurna. (B) Atividade noturna. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$ vs. todos os outros grupos. N=5 animais por grupo.

4.2 A DEFICIÊNCIA DE MyD88 RESULTOU EM MAIOR INTOLERÂNCIA À GLICOSE

Após 3 meses de ração hiperlipídica, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Observamos que os camundongos MyD88 KO obesos têm diminuição da tolerância à glicose comparados aos camundongos WT obesos (Figura 6 A e B). Ainda, ao dosarmos insulina no soro destes camundongos observamos um aumento significativo de insulina sérica no jejum e após 30 e 90 minutos da administração de glicose (Figura 7). A insulina é o principal hormônio na regulação dos níveis de glicose no sangue e, geralmente, uma glicemia normal é mantida pelo equilíbrio entre a ação da insulina e a sua secreção, e defeitos na sua secreção ou na sua ação podem acarretar em uma hiperglicemia crônica (110).

Figura 6 - Teste de tolerância à glicose nos camundongos MyD88 KO. Camundongos foram mantidos em jejum durante 12 horas e submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT) . Foram injetados 2 g/Kg de glicose intraperitoneal. Mensuramos os níveis de glicose circulante nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção de glicose. DIO= obesidade induzida por dieta; AUC= Área sob a curva. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 10 camundongos por grupo.

Figura 7 - Dosagem da concentração de insulina no soro dos camundongos MyD88 KO. Quantificação da concentração de insulina circulante no soro dos camundongos após injeção de glicose durante o GTT. Foram injetados 2 g/Kg de glicose intraperitoneal. O sangue foi coletado no jejum (0), 30 e 90 minutos após a glicose. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$ vs todos os grupos. N= 5 animais por grupo.

4.3 CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS DESENVOLVEM MAIOR RESISTÊNCIA À INSULINA

Visto que observamos uma menor tolerância à glicose e um aumento significativo dos níveis de insulina circulantes nos camundongos MyD88 KO obesos

comparados aos WT obesos, sugerindo que a insulina está sendo secretada, mas não está conseguindo exercer suas funções, e ainda, que a resposta imune inata tem um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina, realizamos um ensaio de ITT para complementar nossos achados.

A análise mostrou que a deficiência de MyD88 leva a um aumento da intolerância à insulina nos camundongos MyD88 KO obesos após os 90 dias de dieta se comparados aos camundongos WT obesos (Figura 8 A e B).

Aprofundando os estudos da via de sinalização da insulina, a análise proteica no tecido adiposo epididimal mostrou uma menor fosforilação de AKT em serina (sítio 473) e em treonina (sítio 308) e diminuição de GLUT-4 (Figura 9). Além disso, a oxidação da glicose e sua incorporação em TAG estimuladas pela insulina no tecido adiposo epididimal estão significativamente diminuídas em relação ao WT obesos (Figura 10 A, B e C).

Figura 8 - Teste de tolerância à insulina nos camundongos MyD88 KO. Camundongos foram mantidos em jejum durante 6 horas e submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT). Foram injetadas 1 unidade/Kg de insulina por animal. Mensuramos os níveis de glicose circulante nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção de glicose. Mag= magro; DIO= obesidade induzida por dieta; AUC=Área sob a curva. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $P < 0.05$. N= 10 camundongos por grupo.

Figura 9 - Análise da via de sinalização da insulina nos camundongos MyD88 KO. Após três meses de dieta o tecido adiposo epididimal foi coletado após estímulo com insulina e realizamos o Western Blotting (WB) para p-AKT 473 (serina), p-AKT 308 (treonina), AKT total, GLUT-4 (Cell signaling 1:1000) e Beta actina (Sigma 1:10000) utilizando 40 microgramas de proteína de extrato total do tecido adiposo epididimal. DIO= obesidade induzida por dieta; AU= unidades arbitrárias. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 4 animais por grupo.

Figura 10 - Incorporação e oxidação de glicose no tecido adiposo epididimal dos camundongos MyD88 KO. (A) Incorporação de glicose ex- vivo no tecido adiposo epididimal após estímulo com insulina em lipídeos totais, (B) Triacilglicerol (TAG) e (C) oxidação de glicose. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5-8 animais por grupo.

4.4 CAMUNDONGOS MYD88 KO OBESOS TÊM MENOR INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSEO E NO FÍGADO

Outro ponto importante a ser observado é a correlação entre resistência à insulina e a inflamação.

Assim, inicialmente, analisamos os níveis de citocinas no tecido adiposo. Observamos diminuição significativa da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo de camundongos MyD88 KO obesos, tais como IL-6, IL-1 β e TNF- α (Figura 11 A, B e C). Ainda por WB avaliamos a expressão proteica de p-JNK e p-IkB α e estas estavam significativamente diminuídas no tecido adiposo dos camundongos MyD88 KO obesos (Figura 11 D, E e F). Além da inflamação no tecido adiposo, analisamos a presença de inflamação no fígado pelos níveis de IL-6 e TNF- α e estas citocinas também apresentaram menor expressão gênica neste tecido (Figura 11 G e H).

Figura 11 - Análise do perfil inflamatório no tecido adiposo epididimal e fígado dos camundongos MyD88 KO. (A, B e C) Análise da expressão de IL-1 beta, TNF-alpha e IL-6 respectivamente no tecido adiposo epididimal dos camundongos. (D, E e F) Western Blotting (WB) para p-JNK e p-IKB α (Cell signaling 1:1000) e Beta actina (Sigma 1:10000) utilizando 40 microgramas de proteína de extrato total do tecido adiposo epididimal. (G e H) Análise da expressão de IL-6 e TNF- α respectivamente no tecido adiposo epididimal dos camundongos. DIO= obesidade induzida por dieta; AU= unidades arbitrárias. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.5 A DEFICIÊNCIA DE MyD88 ACARRETA EM MENOR INFLAMAÇÃO SISTÊMICA, AUMENTO DA SECREÇÃO DE LEPTINA E DIMINUIÇÃO DE ADIPONECTINA

Além da inflamação local, no tecido adiposo, a inflamação sistêmica mostra-se importante no desenvolvimento da obesidade.

Nós determinamos a concentração sérica de TNF- α e IL-6 e observamos que os camundongos MyD88 KO obesos apresentaram uma redução significativa dos níveis destas citocinas comparado aos camundongos WT obesos (Figura 12 A e B). Os níveis diminuídos destas citocinas no soro podem indicar que a obesidade pode estar se desenvolvendo independente da inflamação classicamente descrita na sua gênese. Além das citocinas, muitas adipocinas têm um potencial papel na resistência à insulina, embora nem todos estes papéis sejam bem compreendidos. Por exemplo, a adiponectina é conhecida por desempenhar um papel crucial na sensibilidade à insulina, através do aumento da utilização da glicose e oxidação de ácidos graxos

(111) antagonizando a sinalização de insulina, e é capaz de aumentar a biogênese mitocondrial.

A leptina é também uma importante adipocina envolvida na sinalização de insulina, e sua elevada expressão correlaciona-se diretamente com resistência à insulina (112).

Figura 12 - Análise da inflamação sistêmica nos camundongos MyD88 KO. (A) Análise da concentração de TNF- α e (B) IL-6 no soro. (C) Quantificação de adiponectina no soro. (D) Quantificação de leptina no soro. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N=5-9 animais por grupo.

Analizamos a expressão gênica destas moléculas no tecido adiposo epididimal e observamos diminuição da expressão gênica de adiponectina e aumento de leptina no tecido adiposo epididimal dos camundongos obesos em comparação com os magros (dados não mostrados). Nós também investigamos a concentração sérica

destas moléculas e observamos diminuição da concentração sérica de adiponectina e aumento de leptina nos camundongos MyD88 KO obesos (Figura 12 C e D), corroborando à síndrome metabólica.

4.6 CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM AUMENTO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS DO TIPO M1 (F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺) PARA O TECIDO ADIPOSEO e FÍGADO

Continuando nossos estudos, buscando um possível mecanismo para este fenômeno, analisamos o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo epididimal e no fígado.

Nós observamos que os camundongos MyD88 KO obesos têm aumento do número total de macrófagos do tipo M1 (F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺) por grama de tecido adiposo epididimal em comparação com os camundongos WT obesos, e os macrófagos M2 (F4/80⁺CD11b⁺CD206⁺) estão diminuídos (Figura 13A e B). No tecido adiposo subcutâneo (dados não mostrados), não observamos diferença significativa no número total de células por grama de tecido tanto de macrófagos de perfil M1 como de M2, porém este resultado já era esperado visto que há maior predomínio destas células no tecido adiposo epididimal.

Em todos os tecidos foi possível observar que os camundongos MyD88 KO magros têm diminuída migração ou presença de células de perfil M2.

Se analisarmos porcentagem de células, observamos uma diminuição de células de perfil M2 no tecido adiposo epididimal (Figura 13 C, D e E) e um aumento exacerbado de macrófagos M1 nos camundongos MyD88 KO obesos.

Na análise do fígado, observamos que os camundongos MyD88 KO e WT obesos apresentam um aumento do número total de macrófagos por grama de tecido de perfil M1, e uma diminuição de macrófagos M2 foi observada em todos os grupos

em relação ao controle WT magro (Figura 14 A e B). Não observamos diferença na porcentagem de células M1 entre WT obesos e MyD88 KO obesos. Somente houve diferença entre camundongos WT obesos e magros, e as células M2 estão diminuídas significativamente em relação aos WT magros.

Figura 13 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal dos camundongos MyD88 KO. Mensuramos o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo por citometria de fluxo após 3 meses de ingestão de ração hiperlipídica. (A) Os resultados estão expressos em número de células/gramas de tecido de macrófagos M1 (F480⁺CD11b⁺CD11c⁺) e (B) M2 (F480⁺CD11b⁺CD206⁺). (C) Porcentagem do infiltrado de macrófagos M1 e (D) macrófagos M2. (E) Dot plot representativo da frequência do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo epididimal. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; *p<0.05. N= 5 animais por grupo.

Figura 14 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no fígado dos camundongos MyD88 KO. Mensuramos o infiltrado de macrófagos no fígado por citometria de fluxo após 3 meses de ingestão de ração hiperlipídica. (A) Os resultados estão expressos em número de células/gramas de tecido de macrófagos M1 (F480+ CD11b+ CD11c+) e (B) M2 (F480+ CD11b+ CD206). (C) Porcentagem do infiltrado de macrófagos M1 e (D) macrófagos M2. (E) Dot plot representativo da frequência do infiltrado de macrófagos no fígado. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.7 CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS FALHAM EM PROMOVER INFLAMAÇÃO INTESTINAL

Observando nossos achados, um dos possíveis mecanismos para o desenvolvimento da obesidade nos camundongos MyD88 KO seria a inflamação intestinal, que instigaria uma maior resistência à insulina.

Analizamos a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no intestino e não observamos alterações no intestino delgado, na expressão de IL-1 β e TNF- α entre os grupos (Figura 15 A e B), apesar de uma aparente diminuição. Já a expressão proteica de p-JNK mostrou-se diminuída no intestino delgado dos camundongos MyD88 KO obesos em comparação com os camundongos WT obesos, porém sem significância estatística entre os grupos (Figura 15 C e D).

A análise do intestino grosso mostrou uma diminuição significativa da inflamação nos camundongos MyD88 KO obesos pela expressão gênica de IL-1 β e TNF- α (Figura 16A e B). Ainda, a secreção de IL-6, mensurada no sobrenadante de explante de intestino grosso, mostrou uma significativa diminuição nos camundongos MyD88 KO obesos (Figura 16 C). Não detectamos a secreção de IL-6 no intestino delgado. A expressão proteica de p-JNK também estava significativamente diminuída no intestino grosso desses camundongos (Figura 16 D e E).

A infiltração massiva de bactérias do lúmen intestinal para a lâmina própria após lesão do epitélio pode resultar em respostas inflamatórias danosas. Por outro lado, a diminuição de citocinas pró-inflamatórias no intestino dos camundongos MyD88 KO obesos pode ser um indício de que uma resposta inflamatória normal à presença de microbiota é necessária para manter a homeostase intestinal.

Figura 16 - Análise do perfil inflamatório no intestino grosso dos camundongos MyD88 KO. (A) Expressão gênica de mRNA de IL-1β e (B) TNF-α no intestino delgado foi analisada. (C) Análise da concentração de IL-6 mensurada no explante de intestino grosso. (D) Western Blotting (WB) para p-JNK (Cell signaling 1:1000) e Beta actina (Sigma 1:10000) utilizando 40 microgramas de proteína de extrato total do intestino grosso. (E) quantificação do WB. DIO= obesidade induzida por dieta; AU= unidades arbitrárias. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; * p<0.05. N= 5 animais por grupo.

4.8 A AUSÊNCIA DE MyD88 LEVA A ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Pelo fato de não termos observado concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias no intestino desses camundongos, esperaríamos que a permeabilidade intestinal estivesse normal.

Avaliamos a permeabilidade intestinal por expressão proteica de claudina-1 no intestino delgado e grosso dos camundongos, e observamos uma significativa diminuição da expressão desta molécula no intestino grosso (Figura 17 A e B) dos

camundongos MyD88 KO obesos comparados aos camundongos WT obesos, sugerindo uma aumentada permeabilidade intestinal.

Porém, ao avaliarmos os níveis de LPS circulante, não observamos diferenças entre os grupos (Figura 18 A).

Ao analisarmos os níveis de permeabilidade intestinal pela técnica considerada padrão ouro, FITC-dextran, observamos aumento do extravasamento de FITC-dextran para a corrente sanguínea, sugerindo fortemente um aumento da permeabilidade intestinal nos camundongos WT obesos em comparação aos camundongos WT magros, e entre os camundongos MyD88 KO obesos e seus controles magros também observamos significância estatística na permeabilidade intestinal (Figura 18 B).

A análise da expressão gênica de *Zonula Occludens* (ZO-1) no intestino grosso dos camundongos mostrou significância estatística entre os camundongos WT obesos e MyD88 KO obesos (Figura 18 D). No intestino delgado não observamos diferenças (Figura 18 C).

A análise de ZO-1 por imuno-histoquímica também corrobora estes resultados nos sugerindo uma diminuição na permeabilidade intestinal nos camundongos WT obesos em relação a seus controles magros, onde os camundongos MyD88 KO obesos e MyD88 KO magros apresentaram uma pequena diferença. Mas se compararmos os camundongos WT obesos com os camundongos MyD88 KO obesos, podemos observar uma diminuição da marcação para ZO-1 nos camundongos MyD88 KO obesos (Figura 19).

Figura 17 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos MyD88 KO. (A) Western Blotting (WB) para Claudina-1 (1:1000) e Beta actina (1:10000) utilizando 40 microgramas de proteína de extrato total do intestino delgado e (B) intestino grosso. (C) quantificação do WB para claudina-1 no intestino delgado e (D) intestino grosso. (B) DIO= obesidade induzida por dieta; AU= unidades arbitrárias. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0.05$. N= 4 animais por grupo.

Figura 18 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos MyD88 KO. (A) Dosagem de LPS circulante no soro e (B) FITC-dextran no soro. (C) Expressão gênica de ZO-1 no intestino delgado (D) e intestino grosso (D). DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5-8 animais por grupo.

Figura 19 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos MyD88 KO. Imuno-histoquímica para ZO-1 no intestino delgado e intestino grosso dos camundongos.

4.9 CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE DEFENSINAS E PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS NO INTESTINO

Outro aspecto importante relacionado com a saúde do epitélio intestinal é a secreção de peptídeos antimicrobianos e defensinas.

Pelo fato de termos observado maior permeabilidade intestinal nos camundongos MyD88 KO obesos em comparação com os camundongos WT, a expressão dessas moléculas estaria diminuída nesses camundongos.

Nós observamos que os camundongos MyD88 KO têm uma diminuição significativa na expressão de defensinas (DEF1) e peptídeos antimicrobianos (REG III) no intestino delgado (Figura 20 A e B) mesmo quando alimentados com dieta comum. Não observamos diferenças dessas moléculas no intestino grosso apesar de uma tendência de diminuição (Figura 20 C e D).

Esses resultados corroboram os resultados da permeabilidade intestinal, o que sugere que essas moléculas têm um papel importante para a proteção da barreira intestinal durante o desenvolvimento da obesidade.

Figura 20 - Análise da produção de defensinas e peptídeos antimicrobianos nos camundongos MyD88 KO. Análise da expressão gênica de (A) REG-III e (B) DEFCR-1 no intestino delgado e (C e D) no intestino grosso respectivamente. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.10 CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM DIMINUIÇÃO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES (F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁻CX3CR1⁺) NO INTESTINO

Outro tópico importante a ser observado é a frequência de macrófagos residentes (F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁻CX3CR1⁺) na lâmina própria intestinal. Estas células parecem ser importantes para a proteção contra a inflamação intestinal e a integridade da barreira intestinal (113).

Nós observamos por expressão gênica uma diminuição da expressão de CX3CR1 no intestino grosso dos camundongos MyD88 KO obesos (Figura 21 B). No intestino delgado não observamos diferença estatística (Figura 21 A).

Macrófagos CX3CR1⁺ são abundantes no cólon (97). Como observamos uma diferença significativa na expressão gênica no intestino grosso, avaliamos por citometria de fluxo o infiltrado destas células. O resultado da citometria corroborou a expressão gênica, mostrando uma diminuição significativa destes macrófagos residentes (Figura 21 C). Além disso, observamos diminuição significativa destas células nos linfonodos mesentéricos (Figura 21 D). Este resultado sugere que a presença desses macrófagos no intestino é em parte dependente de MyD88, e que nos nocautes essa diminuição pode estar colaborando o desenvolvimento da obesidade. Além disso, a expressão de MyD88 pelas células de epitélio intestinal é importante para a resposta imune contra antígenos alimentares e microbiota intestinal. A ausência de MyD88 neste órgão pode influenciar a diminuição da frequência destas células na lâmina própria.

Figura 21 - Análise do infiltrado de macrófagos residentes no intestino dos camundongos MyD88 KO. Análise da expressão gênica de CX3CR1 no intestino delgado (A) e intestino grosso (B) e análise por citometria do infiltrado de células CD11c- CD11b+ CX3CR1+ no intestino grosso (C) . Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.11 CAMUNDONGOS MyD88 KO OBESOS TÊM AUMENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS RESIDENTES F480-CD11b-CD11c+CD103+NO INTESTINO E DIMINUIÇÃO DE CÉLULAS T CD4+CD25+FOXP3+

Além da frequência de macrófagos residentes CX3CR1⁺, outra célula que teria papel importante nesse processo são as células dendríticas CD103⁺, sentinelas que sentem sinais inflamatórios e capturam antígenos no lúmen intestinal (89).

Nós observamos que os camundongos MyD88 KO obesos têm um aumento de células dendríticas CD11c⁺CD103⁺ residentes no intestino grosso (Figura 22 A), e uma diminuição significativa da frequência destas células foi observada nos MLNs (Figura 22 B), acompanhada por uma menor ativação (Figura 22 C) analisada pela expressão de CD86. O que sugere que estas células falham em reconhecer os antígenos e migram em menor quantidade para os linfonodos.

Analizamos o infiltrado de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ no intestino grosso (Figura 23 A) e linfonodo mesentérico (Figura 23 B) que se mostrou reduzido nos camundongos obesos, tanto nos WT como MyD88 KO.

É possível que a presença de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ seja dependente da função das células CD11c⁺CD103⁺ residentes no intestino, e pode estar prejudicada na obesidade.

A microbiota comensal pode modular a imunidade do intestino e pode ser um fator chave predispondo a obesidade. A função destas DCs pode ter sido alterada por fatores ambientais da dieta que alteram a função tolerogênica das DCs prejudicando a diferenciação das células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ no intestino e MLNs e ainda, como para os macrófagos residentes que citei acima, a ausência de MyD88 no intestino também pode influenciar na função das DCs.

Figura 22 - Análise do infiltrado de células dendríticas residentes no intestino dos camundongos MyD88 KO. Análise por citometria do infiltrado de células CD11c+ CD11b- CD103+ no intestino grosso (A) e nos linfonodos mesentéricos (B) e ativação das células nos linfonodos (D). Mag= magro e DIO= Obesidade induzida por Dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

Figura 23 - Análise do infiltrado de células T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ no intestino e linfonodo mesentérico dos camundongos MyD88 KO. Análise por citometria do infiltrado de células T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ no intestino grosso (A) e nos linfonodos mesentéricos (B). Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.12 A AUSÊNCIA DE MyD88 MODULA A MICROBIOTA INTESTINAL APÓS DIETA HIPERLIPÍDICA

Nossos resultados sugerem que a molécula adaptadora MyD88 exerce um importante papel no desenvolvimento da obesidade, mas ainda não entendemos aonde sua ausência seria imprescindível nesse modelo.

Seguimos com nossos experimentos e um sequenciamento prévio nos mostrou que os camundongos MyD88 KO obesos têm em maior abundância no intestino o filo *Firmicutes* que está correlacionado com a obesidade, porém não observamos a presença do filo *Bacteroidetes* nestes camundongos MyD88 KO obesos, somente foi observado a presença deste filo antes do início da alimentação com a ração hiperlipídica. Nos camundongos MyD88 KO magros, não observamos diferenças em relação aos camundongos WT magros. Já a microbiota dos camundongos WT obesos mostrou-se condizente com a literatura, em que é descrito que o aumento da proporção de *Firmicutes* e diminuição de *Bacteroidetes* são correlacionados positivamente com o desenvolvimento da obesidade (Figura 24).

Esta alteração da microbiota pode ser ocasionada pelo ambiente, alimentação e genética dos camundongos, podendo modular ou não a resposta imune. Os camundongos MyD88 KO obesos têm maior proporção de *Firmicutes*, que está positivamente relacionado com a obesidade e o filo *Bacteroidetes* desapareceu nesses camundongos. Uma análise mais detalhada da microbiota ainda está sendo realizada.

Figure 24 - Análise da microbiota intestinal por sequenciamento, antes e após dieta hiperlipídica. A análise mostrou diferenças na composição da microbiota intestinal dos camundongos WT obesos e MyD88 KO obesos. Mag= magro e DIO= Obesidade induzida por Dieta. N= pool de 4 animais cada.

4.13 A MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO PROPICIOU ALTERAÇÕES METABÓLICAS NOS CAMUNDONGOS WT

No intuito de verificar se as alterações preliminares vistas na análise da microbiota eram funcionais, nós idealizamos experimentos de transferência de microbiota.

Transplantamos microbiota de camundongos MyD88 KO para camundongos WT e de camundongos WT para WT como controles antes de submetê-los a dieta hiperlipídica e ou normal por 90 dias, conforme discriminados no Material e Métodos.

Observamos que a microbiota dos camundongos MyD88 KO propiciou o ganho de peso pelos camundongos WT alimentados com dieta hiperlipídica (Figura

25 A). Ao final da dieta, observamos que os camundongos WT que receberam microbiota de camundongos MyD88 KO, apresentaram um significativo ganho de peso em comparação aos camundongos WT que receberam microbiota deles mesmos (Figura 25 A e B).

Figura 25 - Análise do ganho de peso após o transplante de microbiota. O peso dos camundongos foi mensurado duas vezes por semana durante 3 meses. (A) Média do ganho de peso entre os grupos durante o período da dieta. (B) Análise final do ganho de peso após 90 dias de dieta. DIO= obesidade induzida por dieta; (g)= gramas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

Ainda, a análise do peso dos tecidos adiposos ao final da dieta confirmou que a microbiota de camundongos MyD88 parece propiciar um aumento no ganho de peso desses camundongos, pois o peso de todos os tecidos adiposos (epididimal, subcutâneo e mesentérico) estava maior se comparados com camundongos que receberam microbiota de camundongos WT (Figura 26 A, B e C).

Quando avaliamos o consumo de oxigênio (VO_2) dos camundongos que receberam microbiota de MyD88 KO comparados com camundongos que receberam microbiota de WT obesos (Figura 27 A e B), tanto durante o ciclo claro como durante o ciclo escuro, observamos uma significativa diminuição do VO_2 o que sugere menor

gasto energético. Além disso, nos ciclos escuro e claro, os camundongos que receberam microbiota de MyD88 KO se alimentados com dieta hiperlipídica, mostraram uma diminuição na razão de troca respiratória (RER) em relação aos camundongos que receberam microbiota de camundongos WT e alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 27 C e D), sugerindo um aumento na oxidação de ácidos graxos induzido pela microbiota de camundongos MyD88 KO após a dieta hiperlipídica.

Figura 26 - Análise do peso dos tecidos adiposos após transplante de microbiota. Após 3 meses de dieta hiperlipídica os tecidos adiposos foram coletados e pesados. (A) Tecido adiposo epididimal. (B) Tecido adiposo subcutâneo. (C) Tecido adiposo mesentérico. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta; (g)=gramas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 4-5 animais por grupo.

Figura 27 - Consumo de oxigênio/produção de dióxido de carbono e determinação da relação de troca respiratória (RER) nos camundongos transplantados. Foram medidos em animais através de um calorímetro indireto de circuito aberto. Os animais foram alimentados durante todo o processo. (A e B) Medida de VO₂. (B e C) Razão VO₂/VCO₂ (RER). DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; * p<0.05. N= 5 animais por grupo.

4.14 CAMUNDONGOS WT TRANSPLANTADOS COM MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO DESENVOLVEM INTOLERÂNCIA À GLICOSE

Devido às alterações nas taxas metabólicas, iniciamos a investigação do perfil metabólico desses camundongos. Realizamos um GTT, e observamos que camundongos transplantados com microbiota de camundongos MyD88 KO desenvolveram severa intolerância à glicose quando comparados com camundongos que receberam microbiota de camundongos WT alimentados com a mesma dieta (Figura 28). Esse resultado confirma que a microbiota de camundongos MyD88 KO tem um papel importante no desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica nestes camundongos.

Figura 28 - Teste de tolerância à glicose após o transplante de microbiota. Camundongos foram mantidos em jejum durante 12 horas e submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT) após 3 meses de dieta hiperlipídica. Foram injetados 2 g/Kg de glicose intraperitoneal. Mensuramos os níveis de glicose circulante nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção de glicose. DIO= obesidade induzida por dieta; AUC=Área sob a curva. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 camundongos por grupo.

4.15 CAMUNDONGOS WT TRANSPLANTADOS COM MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO APRESENTARAM AUMENTO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS COM FENÓTIPO M1 (F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺) PARA O TECIDO ADIPOSEO

Aprofundando nossos estudos, analisamos o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo após o desenvolvimento da obesidade.

Observamos que a microbiota de camundongos MyD88 KO foi capaz de induzir um perfil de macrófagos pró-inflamatórios (M1) (Figura 29 B) no tecido adiposo dos camundongos após dieta hiperlipídica e uma diminuição significativa no infiltrado de macrófagos M2 (Figura 29 A). O perfil inflamatório no tecido adiposo, quando analisamos a expressão gênica de IL-1 β , TNF- α e IL-6, mostrou um aumento da inflamação nos camundongos transplantados com microbiota de camundongos MyD88 KO e alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 30 A, B e C).

Figura 29 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal dos camundongos transplantados. Mensuramos o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo por citometria de fluxo após 3 meses de ingestão de ração hiperlipídica. (A) Porcentagem do infiltrado de macrófagos M1 (F480+ CD11b+ CD11c+)e (B) M2 (F480+ CD11b+ CD206). (E) Dot plot representativo da frequência do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo epididimal. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

Figura 30 - Expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo dos camundongos transplantados. (A, B e C) Análise da expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no tecido adiposo epididimal após a dieta respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.16 MICROBIOTA DOS CAMUNDONGOS MyD88 KO AUMENTOU A PERMEABILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS WT

Para aprofundarmos nossos achados, avaliamos a permeabilidade intestinal ao final da dieta. Encontramos que a microbiota de camundongos MyD88 KO foi eficiente em aumentar a permeabilidade intestinal nos camundongos WT alimentados com dieta hiperlipídica comparados aos camundongos que receberam microbiota de camundongos WT. Também a mesma microbiota proveniente de camundongos MyD88 KO foi capaz de elevar os níveis de permeabilidade intestinal mesmo nos camundongos alimentados com dieta comum transplantados com dieta de camundongos MyD88 KO se comparados aos camundongos transplantados com microbiota WT alimentados com a mesma dieta comum (Figura 31).

Figura 31 - Análise da permeabilidade intestinal após nos camundongos transplantados. Dosagem de FITC-dextran no soro. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 4 animais por grupo.

Observando que camundongos que receberam microbiota de camundongos MyD88 KO e alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram maior permeabilidade intestinal avaliada por FITC-Dextran no soro, analisamos outro parâmetro de permeabilidade intestinal, a marcação para ocludina no intestino delgado e grosso. Observamos uma diminuição significativa na expressão de ocludina

nos camundongos WT transplantados com microbiota de camundongos MyD88 KO e alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 32 A) bem como uma diminuição significativa também no intestino grosso (Figura 32 B). Essa diminuição é comparável a diminuição observada em camundongos MyD88 KO obesos.

Figura 32 - Análise da permeabilidade intestinal após o transplante de microbiota. (A) Western Blotting (WB) para Occludina (1:500) e Beta actina (1:10000) utilizando 40 microgramas de proteína de extrato total do intestino delgado e (B) intestino grosso. DIO= obesidade induzida por dieta; AU= unidades arbitrárias. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 4 animais por grupo.

4.17 MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO INDUZIU INFLAMAÇÃO E DIMINUIU A EXPRESSÃO DE REGIII NO INTESTINO GROSSO DE CAMUNDONGOS WT

Analizamos a expressão dos genes pró-inflamatórios IL-1 β e TNF- α no intestino delgado e intestino grosso dos camundongos.

Observamos um aumento sem significância estatística de IL-1 β no intestino delgado de camundongos WT transplantados com microbiota de camundongos WT e camundongos MyD88 KO e alimentados com dieta hiperlipídica comparados aos

controles magros (Figura 33 A). Não observamos diferenças na expressão gênica de TNF- α entre os grupos (Figura 33 B). A análise do intestino grosso mostrou um aumento significativo na expressão gênica de IL-1 β (Figura 33 C) nos camundongos transplantados com microbiota de camundongos MyD88 KO e após a dieta hiperlipídica. Não foram observadas diferenças na expressão gênica de TNF- α (Figura 33 D).

Figura 33 - Análise do perfil inflamatório no intestino após o transplante de microbiota. (A e B) Expressão gênica de mRNA de IL-1 β e TNF- α no intestino delgado e (C e D) no intestino grosso. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

A análise da expressão gênica da defensina REGIII γ não mostrou diferenças na sua expressão no intestino delgado entre os grupos de camundongos transplantados com microbiota de camundongos MyD88 e alimentados com ração comum comparados

aos camundongos alimentados com ração hiperlipídica (Figura 34 A). Já no intestino grosso, observamos diminuição da expressão dessas moléculas nos camundongos transplantados com microbiota de camundongos MyD88 KO em ambas as dietas, hiperlipídica e comum comparados aos camundongos transplantados com microbiota de camundongos WT e alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 34 B). Tudo indica que a microbiota intestinal de camundongos MyD88 KO tem um papel importante na indução de uma resposta imune no intestino. As células parecem falhar em responder a essa microbiota.

Figura 34 - Análise da produção de peptídeos antimicrobianos após o transplante de microbiota. Análise da expressão gênica de REG-III (A) no intestino delgado e (B) intestino grosso. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.18 MICROBIOTA DE CAMUNDONGOS MyD88 KO DIMINUI A EXPRESSÃO DE CX₃CR₁ NO INTESTINO GROSSO E A FREQUÊNCIA DE MACRÓFAGOS RESIDENTES CD11c⁻ CD11b⁺ CX₃CR₁⁺

A análise da expressão gênica de CX₃CR₁ mostrou uma diminuição significativa de sua expressão no intestino grosso, corroborando os dados observados nos camundongos MyD88 KO (Figura 35 A e B). A análise da frequência destas células na lâmina própria também mostrou uma significativa diminuição em ambos

os grupos transplantados com microbiota de camundongos MyD88 KO (Figura 35 C).

Esse resultado nos sugere que a presença de macrófagos residentes no intestino desses camundongos parece ser dependente de algum fator secretado pela microbiota dos camundongos MyD88 KO que levou a diminuição da frequência destas células.

Este dado é inédito, mostrando o papel destas células no desenvolvimento da obesidade dependente de alterações na microbiota intestinal.

Figura 35 - Análise do infiltrado de macrófagos residentes no intestino após transplante de microbiota. Análise da expressão gênica de CX3CR1 no intestino delgado (A) e intestino grosso (B) e análise por citometria do infiltrado de células CD11c-CD11b+CX3CR1+ no intestino grosso (C). DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.19 CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO DE MyD88 NO TECIDO ADIPOSEO DESENVOLVEM OBESIDADE SEMELHANTE AOS CONTROLES SELVAGENS

Buscando-se melhor entender e explicar o papel de MyD88 no desenvolvimento da obesidade observada nos camundongos MyD88 KO e a associação da obesidade com a falha em montar uma resposta imune clássica, utilizamos camundongos com deleção específica de MyD88 somente em adipócitos, e não em macrófagos ativados ou residentes e outros tecidos como músculo e fígado (11), o que excluiria a interferência direta da ausência de MyD88 no intestino e nos macrófagos.

Alimentamos camundongos *Adiponectina^{Cre+}MyD88^{Flox+/+}* com dieta hiperlipídica por 120 dias, pois não observamos diferenças após 90 dias, como nos outros experimentos. Então, resolvemos manter a dieta por um tempo maior e não observamos diferenças no ganho peso entre os grupos (Figura 36).

A análise do peso dos tecidos adiposos, epididimal, subcutâneo e mesentérico, mostrou uma sutil diferença entre os camundongos *Adiponectina^{Cre+}MyD88^{Flox+/+}* DIO e *Adiponectina^{Cre-}MyD88^{Flox+/+}* DIO (Figura 37 A, B e C).

Ainda, buscando respostas para nosso fenótipo analisando o consumo de oxigênio de ambos os grupos (*Adiponectina^{Cre+}MyD88^{Flox+/+}* magro, *Adiponectina^{Cre+}MyD88^{Flox+/+}* DIO, *Adiponectina^{Cre-}MyD88^{Flox+/+}* magro e *Adiponectina^{Cre-}MyD88^{Flox+/+}* DIO), observamos que os camundongos *Adiponectina^{Cre+}MyD88^{Flox+/+}* obesos apresentaram maior consumo de oxigênio (VO₂) comparados camundongos *Adiponectina^{Cre-}MyD88^{Flox+/+}* obesos (Figura 38A e B) tanto durante o ciclo claro como durante o ciclo escuro, o que sugere um maior gasto de energia. Além disso, no ciclo escuro os camundongos *Adiponectina^{Cre+}MyD88^{Flox+/+}* obesos mostraram um aumento na razão de troca respiratória (RER) em relação aos camundongos

Adiponectina^{cre}-*MyD88*^{Flox+/+} obesos (Figura 38 C e D), sugerindo uma diminuição na oxidação de ácidos graxos quando MyD88 está depletado no tecido adiposo.

Figura 36 - Análise do ganho de peso dos camundongos *Adiponectina*^{Cre}. O peso dos camundongos foi mensurado duas vezes por semana durante 3 meses. (A) Média do ganho de peso entre os grupos durante o período da dieta. (B) Análise final do ganho de peso após 90 dias de dieta. DIO= obesidade induzida por dieta; (g)= gramas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 6 animais por grupo.

Figura 37 - Análise do peso dos tecidos adiposos dos camundongos *Adiponectina*^{Cre}. Após 3 meses de dieta hiperlipídica os tecidos adiposos foram coletados e pesados. (A) Tecido adiposo epididimal. (B) Tecido adiposo subcutâneo. (C) Tecido adiposo mesentérico. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta; (g)= gramas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 6-8 animais por grupo.

Figura 38 - Consumo de oxigênio / produção de dióxido de carbono e determinação da relação de troca respiratória (RER) dos camundongos *Adiponectina^{Cre}*. Foram medidos em animais através de um calorímetro indireto de circuito aberto. Os animais foram alimentados durante todo o processo. (A) Medida de VO₂. (B) Razão VO₂/VCO₂ (RER). DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; * p<0.05. N= 5 animais por grupo.

4.20 DELEÇÃO DE MyD88 NO TECIDO ADIPOSEO CONFERIU INTOLERÂNCIA À GLICOSE E RESISTÊNCIA À INSULINA SEMELHANTE AOS CONTROLES SELVAGENS

A análise da tolerância à glicose mostrou que não há diferenças entre os camundongos *Adiponectina^{cre+MyD88^{flox+/+}}* DIO e *Adiponectina^{cre-MyD88^{flox+/+}}* DIO (Figura 39). Comparados aos camundongos magros, estes animais desenvolvem o mesmo grau de intolerância à glicose.

Também, analisamos a tolerância à insulina nesses camundongos e observamos o mesmo fenótipo. Ambos são intolerantes à insulina (Figura 40), mostrando que a expressão MyD88 no tecido adiposo não desempenha um papel de suma importância no desenvolvimento da síndrome metabólica.

Figura 39 - Teste de tolerância à glicose dos camundongos Adiponectina^{Cre}. Camundongos foram mantidos em jejum durante 12 horas e submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Foram injetados 2 g/Kg de glicose intraperitoneal. Mensuramos os níveis de glicose circulante nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção de glicose. DIO= obesidade induzida por dieta; AUC=Área sob a curva. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; * p<0.05. N= 10 camundongos por grupo.

Figura 40 - Teste de tolerância à insulina nos camundongos Adiponectina^{Cre}. Camundongos foram mantidos em jejum durante 6 horas e submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT). Foram injetadas 1 unidade/Kg de insulina por animal. Mensuramos os níveis de glicose circulante nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção de glicose. Mag= magro; DIO= obesidade induzida por dieta; AUC=Área sob a curva. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; *p<0.05. N= 10 camundongos por grupo.

4.21 DELEÇÃO DE MyD88 NO TECIDO ADIPOSEO NÃO ALTEROU A MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA O TECIDO ADIPOSEO APÓS DIETA HIPERLIPÍDICA

Ainda, buscando respostas para nossas perguntas e sabendo que aos macrófagos é consistentemente imputado um papel crucial no desenvolvimento da obesidade, avaliamos se a ausência de MyD88 no tecido adiposo, ditaria uma maior migração de macrófagos M1 ou M2 para o tecido adiposo.

Observamos que os camundongos controles *Adiponectina^{cre}-MyD88^{flox+/+}* alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram um aumento significativo na porcentagem de macrófagos M1 (F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺) no tecido adiposo, e uma diminuição significativa de macrófagos M2 (F4/80⁺CD11b⁺CD206⁺) comparados aos camundongos magros. Não observamos diferenças quando analisamos o infiltrado destas células nos camundongos *Adiponectina^{cre+}MyD88^{flox+/+}* alimentados com dieta hiperlipídica se comparados aos controles magros ou se comparados aos camundongos *Adiponectina^{cre}-MyD88^{flox+/+}* obesos (Figura 41). A análise do número total de células não mostrou diferenças entre os grupos.

Esse dado indica que a mudança de fenótipo dos macrófagos que migram para o tecido adiposo durante a obesidade não depende da expressão de MyD88 no tecido adiposo.

Além disso, não observamos diferenças na análise do perfil inflamatório pela expressão gênica de IL-6 e TNF- α no tecido adiposo epididimal (Figura 42 A e B). Camundongos *Adiponectina^{cre+}MyD88^{flox+/+}* apresentaram inflamação semelhante aos camundongos *Adiponectina^{cre}-MyD88^{flox+/+}* alimentados com dieta hiperlipídica.

Figura 41 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal dos camundongos Adiponectina^{Cre}. Mensuramos o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo por citometria de fluxo após 3 meses de ingestão de ração hiperlipídica. (A) Os resultados estão expressos em número de células/gramas de tecido de macrófagos M1 (F480⁺CD11b⁺CD11c⁺) e (B) M2 (F480⁺CD11b⁺CD206⁺). (C) Porcentagem do infiltrado de macrófagos M1 e (D) macrófagos M2. (E) Dot plot representativo da frequência do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo epididimal. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

Figura 42- Expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo dos camundongos *Adiponectina*^{Cre}. Análise da expressão de TNF- α e IL-6 no tecido adiposo epididimal dos camundongos. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.22 DELEÇÃO DE MyD88 NO TECIDO ADIPOSEO NÃO PROTEGE OS CAMUNDONGOS DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL

No intuito de mostrar que a expressão de MyD88 no tecido adiposo não influenciaria outros fatores que são correlacionados com o desenvolvimento da obesidade, analisamos a permeabilidade intestinal pelo teste de FITC-Dextran e observamos que os camundongos apresentaram um aumento da permeabilidade intestinal semelhante aos controles selvagens mostrando níveis de extravasamento de dextran marcado com FITC para o soro a níveis dos camundongos *Adiponectina*^{cre-MyD88^{flox+/+}}. Ambos os grupos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram um aumento significativo da permeabilidade intestinal em relação aos controles magros (Figura 43).

Os resultados utilizando MyD88 KO obesos demonstraram que MyD88 parece não exercer um papel tão importante para a sinalização da insulina e captação de glicose pelas células do tecido adiposo. Este resultado com os camundongos

Adiponectina^{cre}MyD88^{flox+/+} nos sugere que outras células, ou outros tecidos podem ser responsáveis por este fenômeno. A ausência de MyD88 no tecido adiposo colabora para o desenvolvimento da obesidade e aumento permeabilidade intestinal.

Figura 43 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos *Adiponectina^{Cre}*. Dosagem de FITC-dextran no soro. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 4 animais por grupo.

4.23 A DELEÇÃO DE MYD88 NOS MACRÓFAGOS PROTEGE OS CAMUNDONGOS DO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Ainda, tentando explicar o papel de MyD88 no desenvolvimento da obesidade, após observarmos que a deleção de MyD88 no tecido adiposo utilizando camundongos *Adiponectina^{cre}MyD88^{flox+/+}* conferiu adiposidade semelhante aos controles, nosso intuito aqui é mostrar especificamente o papel dos macrófagos neste processo.

Sabendo que a migração de macrófagos para o tecido adiposo está positivamente correlacionada com o desenvolvimento da obesidade e MyD88 desempenha um importante papel neste processo, já que camundongos MyD88 KO desenvolvem uma severa síndrome metabólica se comparados aos camundongos

selvagens, nós geramos camundongos deficientes em MyD88 somente nas células mielóides (*Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}*).

Acompanhamos o ganho de peso desses camundongos e seus respectivos controles durante dois meses de alimentação com ração hiperlipídica. Nossos dados de ganho de peso mostram que a ausência de MyD88 em macrófagos protege os camundongos MyD88 do desenvolvimento da obesidade (Figura 44 A e B). Podemos observar que os camundongos *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}* ganham menos peso que os camundongos *Lisozima^{cre-}MyD88^{flox+/+}* alimentados com ração hiperlipídica.

Ainda, o peso dos tecidos adiposos coletados após dois meses de dieta confirma o que foi observado no ganho de peso desses camundongos (Figura 45 A, B e C). O peso do tecido adiposo epididimal, subcutâneo e mesentérico está significativamente menor nos camundongos *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}* quando comparados aos camundongos *Lisozima^{cre-}MyD88^{flox+/+}* também alimentados com ração hiperlipídica.

Não podemos afirmar que esta resposta é específica de macrófagos, mas por se tratar de um modelo em que os macrófagos exercem um grande papel, pode ser um resultado importante que explica o fenômeno que observamos nos camundongos MyD88 KO.

Figura 44 - Análise do ganho de peso dos camundongos *Lisozima^{cre}*. O peso dos camundongos foi mensurado duas vezes por semana durante 3 meses. (A) Média do ganho de peso entre os grupos durante o período da dieta. (B) Análise final do ganho de peso após 90 dias de dieta. DIO= obesidade induzida por dieta; (g)= gramas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 6 animais por grupo.

Figura 45 - Análise do peso dos tecidos adiposos nos camundongos *Lisozima^{cre}*. Após 3 meses de dieta hiperlipídica os tecidos adiposos foram coletados e pesados. (A) Tecido adiposo epididimal. (B) Tecido adiposo subcutâneo. (C) Tecido adiposo mesentérico. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta; (g)=gramas. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 6-8 animais por grupo.

Ainda, encontramos que os camundongos *Lisozima^{cre+MyD88^{flox+/+}}* obesos têm maior consumo de oxigênio (VO₂) comparados camundongos *Lisozima^{cre-}*

MyD88^{lox+/+} obesos (Figura 46 A e B) tanto durante o ciclo claro como durante o ciclo escuro, o que sugere um maior gasto de energia. Além disso, nos ciclos escuro e claro os camundongos *Lisozima^{cre+}MyD88^{lox+/+}* obesos mostraram um aumento na razão de troca respiratória (RER) em relação aos camundongos *Lisozima^{cre+}MyD88^{lox+/+}* (Figura 46 C e D) sugerindo uma diminuição na oxidação de ácidos graxos quando MyD88 está depletado nos macrófagos. Esse resultado nos sugere que MyD88 nos macrófagos tem um papel importante no desenvolvimento da obesidade, quando avaliamos o ganho de peso e as taxas metabólicas desses camundongos e que a depleção sistêmica de MyD88 está exercendo um papel importante em algum tecido ou órgão específico facilitando o ganho de peso.

Figura 46 - Consumo de oxigênio/produção de dióxido de carbono e determinação da relação de troca respiratória (RER) dos camundongos *Lisozima^{cre}*. Foram medidos em animais através de um calorímetro indireto de circuito aberto. Os animais foram alimentados durante todo o processo. (A e B) Medida de VO₂. (B e C) Razão VO₂/VCO₂ (RER). DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; * p<0.05. N= 5 animais por grupo.

4.24 CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO DE MYD88 NOS MACRÓFAGOS APRESENTAM AUMENTO DA TOLERÂNCIA À GLICOSE E SENSIBILIDADE À INSULINA

Seguindo com nossos estudos em camundongos *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}*, analisamos o GTT e o ITT.

Observamos que camundongos *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}* alimentados com dieta hiperlipídica são mais tolerantes à glicose do que camundongos *Lisozima^{cre}MyD88^{flox+/+}* alimentados com a mesma dieta. Os níveis de tolerância podem ser comparados com camundongos magros alimentados com dieta comum (Figura 47).

Ao avaliarmos a sensibilidade à insulina, podemos observar que os camundongos *Lisozima^{cre+}MyD88^{flox+/+}* são mais sensíveis à insulina se compararmos aos camundongos *Lisozima^{cre}MyD88^{flox+/+}* na mesma dieta (Figura 48).

Esses resultados nos sugerem que a expressão MyD88 nas células imunes exerce um papel importantíssimo no desenvolvimento da síndrome metabólica. A pergunta é, em qual célula a depleção de MyD88 está agravando o quadro metabólico que observamos nos camundongos MyD88 KO?

Figura 47 - Teste de tolerância à glicose dos camundongos *Lisozima^{cre}*. Camundongos foram mantidos em jejum durante 12 horas e submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT) . Foram injetados 2 g/Kg de glicose intraperitoneal. Mensuramos os níveis de glicose circulante nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção de glicose. DIO= obesidade induzida por dieta; AUC=Área sob a curva. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * p<0.05. N= 10 camundongos por grupo.

Figura 48 - Teste de tolerância à insulina dos camundongos *Lisozima*^{cre}. Camundongos foram mantidos em jejum durante 6 horas e submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT). Foram injetadas 1 unidade/Kg de insulina por animal. Mensuramos os níveis de glicose circulante nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após injeção de glicose. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta; AUC=Área sob a curva. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; *P<0.05. N= 10 camundongos por grupo.

4.25 DELEÇÃO DE MyD88 NOS MACRÓFAGOS INIBE A MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE FENÓTIPO M1 PARA O TECIDO ADIPOSEO

Após observarmos que a depleção de MyD88 nas células mielóides protegeu os camundongos do ganho de peso e resistência à insulina, analisamos o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo epididimal desses camundongos e observamos, como esperado, que os camundongos *Lisozima*^{cre+MyD88^{flox}+/+} alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram diminuída frequência de macrófagos de perfil M1 (F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺) no tecido adiposo epididimal e aumento da frequência de macrófagos do tipo M2 (F4/80⁺CD11b⁺ CD206⁺) (Figura 48 A, B e C). Ainda, a análise do numero absoluto de macrófagos no tecido adiposo epididimal corroborou a porcentagem tanto para macrófagos M1 como para M2 (Figura 48 D e E).

Esse achado nos sugere que a expressão de MyD88 nas células mielóides pode favorecer um fenótipo M1 nos macrófagos o que pode agravar um quadro de síndrome metabólica.

Porém, observando os resultados dos camundongos MyD88 KO, eles apresentam polarização de macrófagos M1 no tecido adiposo, sugerindo que naqueles camundongos a ausência de MyD88 pode ativar alguma via de sinalização que estaria tentando de alguma forma compensar a falta da inflamação classicamente mostrada na obesidade, exacerbando o desenvolvimento da síndrome metabólica.

Figura 49 - Análise do infiltrado de macrófagos, M1 e M2 no tecido adiposo epididimal dos camundongos *Lisozima^{cre}*. Mensuramos o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo por citometria de fluxo após 3 meses de ingestão de ração hiperlipídica. (A) Os resultados estão expressos em número de células/gramas de tecido de macrófagos M1 (F480+ CD11b+ CD11c+) e (B) M2 (F480+ CD11b+ CD206). (C) Porcentagem do infiltrado de macrófagos M1 (F480+ CD11b+ CD11c+) e (D) M2 (F480+ CD11b+ CD206). (E) Dot plot representativo da frequência do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo epididimal. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5 animais por grupo.

4.26 DELEÇÃO DE MYD88 NOS MACRÓFAGOS PROTEGE OS CAMUNDONGOS DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL

Para investigarmos mais em detalhes o papel de MyD88 nas células mielóides no desenvolvimento da obesidade, nós mensuramos a permeabilidade intestinal desses camundongos por FITC-Dextran. Nós observamos como já esperado, que camundongos que não expressam MyD88 nas células mielóides alimentados com dieta hiperlipídica são protegidos do aumento da permeabilidade intestinal se compararmos com camundongos *Lisozima^{cre}-MyD88^{flox+/+}* alimentados com a mesma dieta (Figura 50).

Figura 50 - Análise da permeabilidade intestinal dos camundongos *Lisozima^{cre}*. Dosagem de FITC-dextran no soro. Mag= magro e DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; *p<0.05. N=4 animais por grupo.

4.27 MyD88 É ESSENCIAL DURANTE UMA INFECÇÃO LETAL ASSOCIADA A OBESIDADE

Em pacientes criticamente doentes com sepse, a obesidade também tem sido associada a um aumento na morbidade e a respostas alteradas ao estresse inflamatório agudo decorrente da sepse (114). Ainda, modelos murinos também têm mostrado que há maior mortalidade em camundongos obesos após a sepse e além da

obesidade, a falha do sistema imune em responder à infecção é descrita por aumentar a mortalidade durante um quadro séptico (115-119). Experimentalmente, evidências mostraram que há uma intensa produção de citocinas inflamatórias e pró-trombogênicas em camundongos obesos em comparação com camundongos sépticos magros (120), sendo que os mecanismos exatos subjacentes a este fenômeno ainda são desconhecidos.

Pensando em nosso modelo de obesidade em camundongos MyD88 KO, por observarmos aumento no ganho de peso e resistência à insulina, porém sem alterações na secreção de citocinas pró-inflamatórias, associamos à obesidade a um modelo de sepse severa induzido por CLP.

Inicialmente, observamos que camundongos MyD88 KO obesos submetidos à sepse falham em secretar citocinas pró-inflamatórias comparados aos camundongos WT obesos também submetidos à sepse. A secreção de IL-6, TNF, IL17 e IFN- γ estão diminuídos na cavidade peritoneal dos camundongos MyD88 obesos sépticos após 24 horas (Figura 51 A, B, C e D). Ainda, a análise da contagem bacteriana após 24 horas mostrou significativo crescimento bacteriano no peritônio dos camundongos MyD88 KO obesos comparados aos camundongos WT (Figura 51 E). Isso pode estar associado à diminuição da inflamação que não permite uma eficiente depuração bacteriana. Isso se confirmou quando analisamos a frequência de células GR1+ na cavidade peritoneal. Observamos que camundongos MyD88 KO obesos submetidos à sepse apresentaram diminuída frequência de neutrófilos na cavidade peritoneal após 24h (Figura 51 F e G). Juntos, esses dados indicam que MyD88 é essencial para o reconhecimento de patógenos iniciando a resposta imune durante a sepse.

Nossos achados indicam que a inflamação clássica, com produção de TNF e IL-6 pode desempenhar um papel importante também no controle do desenvolvimento da obesidade.

Figura 51 - Análise do perfil inflamatório após sepse polimicrobiana em camundongos MyD88 KO. (A, B, C e D) Análise da secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF, IL17 e IFN-γ no lavado peritoneal dos camundongos após a sepse. (E) Contagem bacteriana na cavidade peritoneal após 24 horas de sepse. (F) Análise do infiltrado de macrófagos na cavidade peritoneal após 24 horas da indução da sepse. CFU= Unidades formadoras de colônia; DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média ± desvio padrão; * p<0.05. N= 3-5 animais por grupo.

4.28 A AUSÊNCIA DE MyD88 EXACERBOU A ATIVAÇÃO DE DECTINA E SUA VIA DE SINALIZAÇÃO

Na busca por um mecanismo que possa justificar os nossos dados obtidos até o momento, nós investigamos possíveis vias que estariam super ativadas na ausência de MyD88 o que poderia induzir um processo inflamatório, classicamente ainda não

descrito no desenvolvimento da obesidade, levando a um aumento da polarização de macrófagos M1 e o desenvolvimento da resistência à insulina.

Uma molécula multifuncional sabidamente conhecida por reconhecer fungos, passou a ser ponto de nosso interesse. A dectina-1 que atua independentemente de TLRs (121) pode reconhecer células tumorais e iniciar uma resposta imune através da secreção de INF do tipo I, principalmente, IFN- β (122). Por ser um receptor multifuncional, alguns fatores secretados durante a obesidade, como colesterol e ácidos graxos que estão elevados durante a obesidade nos camundongos MyD88 KO (dados não mostrados) poderiam ser reconhecidos via dectina-1 e colaborar para o fenótipo de resistência à insulina que observamos nos camundongos MyD88 KOs.

Realizamos real time PCR para dectina-1 no tecido adiposo dos camundongos WT e MyD88 KO alimentados com dieta normal e dieta hiperlipídica e observamos que a expressão de dectina-1 estava significativamente mais expressa no tecido adiposo dos camundongos MyD88 KOs comparados aos camundongos WT (Figura 52 A).

Ainda, SyK (do inglês *Spleen Tyrosine Kinase*) uma tirosina quinase que se liga a dectina-1 e é ativada resultando na transdução de fatores através de moléculas de sinalização que estão *downstream* também estava significativamente aumentada, sugerindo que há ativação de uma via inflamatória mesmo na ausência de MyD88 (Figura 52 B). Ainda, esta molécula pode ser ativada via TLR4. Porém, esta ativação não resultaria na secreção de citocinas sabidamente conhecidas por terem um papel importante no desenvolvimento da obesidade.

No entanto, IRF5 mostrou-se significativamente aumentado em comparação com os camundongos WT obesos (Figura 52 C), e esta molécula é conhecida por induzir interferons do tipo I. Nós observamos significativo aumento da expressão de

RNA α de IFN- β no tecido adiposo dos camundongos MyD88 KO obesos (Figura 52 D).

Por outro lado, como não vimos aumento da fosforilação de JNK e IKB, nós observamos um aumento na fosforilação de ERK (Figura 52 E) nos camundongos MyD88 KO obesos em comparação com os camundongos magros. Essa molécula é induzida por SyK, e induz a expressão de IRF5.

Acreditamos que essa resposta possa estar ocorrendo via macrófagos M1, que estão aumentados no tecido adiposo dos camundongos MyD88 KO, e estudos futuros elucidarão nossa hipótese mecanística.

Figura 52 - Ativação da via da Dectina em camundongos MyD88 KO. Análise da expressão de Dectina-1, Syk, IRF5 e IFN- β respectivamente no tecido adiposo epididimal dos camundongos (A, B, C e D). (E) Western Blotting (WB) para p-ERK (1:1000) e Beta actina (1:10000) utilizando 40 microgramas de proteína de extrato total do tecido adiposo epididimal. DIO= obesidade induzida por dieta. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0.05$. N= 5-8 animais por grupo.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que a molécula adaptadora MyD88 desempenha um papel de extrema importância no desenvolvimento da obesidade. Neste trabalho, nós mostramos que a ausência de MyD88 desencadeou alterações metabólicas severas nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, com um padrão inflamatório diferente do observado na obesidade em animais selvagens.

A última década tem revelado novos mecanismos sobre o papel da resposta imune inata no desenvolvimento da obesidade e na resistência periférica à insulina. Estudos anteriores já estabeleceram que a expansão do tecido adiposo, tal como observado na obesidade, está associada a uma resposta inflamatória crônica e em resistência à insulina (123). Recentemente estudos têm implicado o tecido adiposo no processo inflamatório, demonstrando que os adipócitos maduros e pré-adipócitos de origem murina expressam múltiplos TLRs desde TLR1 a TLR9 (124-126). Modelos experimentais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica estão associados com um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (33, 34), e uma intensa infiltração de macrófagos com perfil pró-inflamatório (35). O adipócito também apresenta resposta imune inata clássica associada à obesidade iniciada pela ativação de TLR2 e TLR4, de NF- κ B e aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (36, 37).

Embora mais de um mecanismo seja capaz de induzir resistência à insulina, o papel da imunidade inata parece ser o caminho comum de como a inflamação pode mediar a patogênese da resistência à insulina em diferentes tecidos (127). Camundongos com deficiência de TLR4 e TLR2 são protegidos da obesidade e resistência à insulina (21, 128). Mas por outro lado camundongos deficientes em TLR5 desenvolvem resistência à insulina e obesidade, e estas alterações são consequência de alterações na microbiota intestinal (20).

Sabendo disso, esperávamos encontrar uma proteção ao desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica nos camundongos MyD88 KO alimentados com dieta hiperlipídica se comparados a camundongos WT, já que sabidamente é através da molécula adaptadora MyD88 que as principais vias de sinalização inflamatórias são ativadas. Porém, o que observamos foi exatamente o contrário. Esses camundongos desenvolveram severa obesidade na ausência de MyD88, falharam em responder à insulina secretada, mostrando-se mais intolerantes à glicose e resistentes à insulina.

O aumento da intolerância à glicose observada nos camundongos MyD88 KO obesos está relacionado a diminuição da ação da insulina e não a sua secreção, já que observamos uma maior concentração de insulina no soro. Um possível mecanismo responsável pela menor captação de glicose poderia ser a através da via MyD88 no tecido adiposo já que observamos menor tolerância à glicose nestes camundongos.

Apesar da diferença observada no ITT ser sutil, observamos que a via de sinalização da insulina está severamente comprometida nos camundongos MyD88 KO obesos. Estes resultados nos sugerem que há uma diminuição da captação de glicose pelas células do tecido adiposo e que MyD88 é uma molécula importante para a ativação desta via, visto que os níveis de insulina no soro e a resistência à insulina estão aumentadas camundongos MyD88 KO obesos.

Ainda, a depleção de MyD88 causou menor gasto energético e oxidação de ácidos graxos após a dieta hiperlipídica, confirmando o importante papel de MyD88 na regulação desses processos. No entanto, o exato mecanismo envolvido ainda não é compreendido.

Por muito tempo o tecido adiposo foi considerado como um tecido dedicado principalmente ao armazenamento de energia, no entanto, é agora reconhecido como um tecido ativo na regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo

imunidade e inflamação. O tecido adiposo produz e libera uma variedade de citocinas e adipocinas (anti ou pró-inflamatórias), incluindo a leptina e a adiponectina, bem como TNF- α , IL-6, entre outros (129). Essas moléculas pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo têm sido implicadas no desenvolvimento de doenças metabólicas como a diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (130).

Sabendo que a inflamação no tecido adiposo leva à resistência a insulina, analisamos os níveis de IL-6, IL-1 β e TNF- α no tecido adiposo e observamos que essas citocinas pró-inflamatórias estavam significativamente reduzidas nos camundongos MyD88 KO obesos. Aparentemente, a ausência de MyD88 não está desencadeando a inflamação classicamente descrita na obesidade, porém os camundongos estão severamente comprometidos pela síndrome metabólica.

Ainda, a fosforilação de moléculas envolvidas na transcrição de NF- κ B para o núcleo das células, tais como JNK e I κ B estão significativamente diminuídas no tecido adiposo epididimal desses camundongos e isso corrobora a menor inflamação local observada nesses animais.

A inflamação sistêmica é outra alteração importante observada na obesidade. Geralmente, assume-se que a inflamação é um estado consequente à obesidade. Entretanto, alguns autores sugerem que a obesidade é o resultado de uma doença inflamatória. Na verdade, a obesidade e a inflamação estão associadas e apresentam contribuição cíclica no agravamento de ambas.

O que encontramos foi que os camundongos MyD88 KO não apresentavam níveis plasmáticos elevados de citocinas pró-inflamatórias se comparados aos camundongos WT, o que nos leva a crer que a inflamação de certa forma é importante para a regulação da resposta imune durante o desenvolvimento da obesidade. Por outro lado, outras vias de sinalização independentes de MyD88 podem estar ativas, apesar de não termos indícios na literatura de que existem vias

alternativas independentes de secreção de citocinas pró-inflamatórias atuando durante a obesidade.

Na obesidade há expansão do tecido adiposo com hiperplasia e hipertrofia celular, juntamente com infiltração de macrófagos aumentada e, por consequência, a inflamação (131). Modelos experimentais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica estão associados com um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (33, 34), e uma intensa infiltração de macrófagos com perfil pró-inflamatório(35). A ativação de macrófagos recentemente foi definida em dois perfis, M1 (CD11c) e M2 (CD206) (61, 62, 132).

Vários estudos têm descrito que, em animais magros, macrófagos alternativamente ativados (M2) predominam, mas, com o desenvolvimento da obesidade, há o recrutamento e acumulação de macrófagos classicamente ativados (M1), gigantes multinucleados que expressam CD11c como marcador de polarização (58, 133-135).

Corroborando diversos autores (133, 134, 136), nós encontramos aumentado número de macrófagos de perfil M1 nos camundongos obesos e este aumento foi ainda mais expressivo quando avaliamos os camundongos MyD88 KO obesos. Quanto à presença de macrófagos de perfil M2, estes estavam diminuídos nos camundongos MyD88 obesos.

Esses resultados nos sugerem que há uma modulação no perfil de macrófagos na ausência de MyD88 no tecido adiposo e no fígado. A ausência de MyD88 está influenciando uma maior infiltração de macrófagos do tipo M1 e diminuição do fenótipo M2 na obesidade. Tudo indica que a deleção de MyD88 nestes camundongos está influenciando também a migração de macrófagos e a troca de fenótipo destas células, o que pode exacerbar a obesidade. Como essa deleção é em

todos os tecidos e células do camundongo, é difícil afirmar em qual célula e/ou tecido MyD88 é importante para o desenvolvimento da obesidade.

Aparentemente as células M1 estão exercendo um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina nos camundongos MyD88 KO. Nossos dados mostram que a ausência de MyD88 pode exacerbar algum fator que possivelmente está estimulando a diferenciação M1 dos macrófagos no tecido adiposo.

Pensando em possíveis mecanismos, iniciamos a investigação do perfil inflamatório no intestino.

A capacidade da maioria dos indivíduos de manter-se saudável na presença de números enormes de bactérias intestinais é uma prova da eficácia do sistema imune intestinal na manutenção da homeostase (137, 138). Diversas evidências experimentais e clínicas sugerem que uma resposta imune desregulada a componentes da flora intestinal desempenha um papel importante na patogênese da lesão inflamatória do tecido que é observada em doenças como a Doença de Crohn e Colite Ulcerativa. Porém na obesidade, não sabemos ao certo o papel da inflamação intestinal. Sabe-se que o intestino tem um papel importante na absorção de nutrientes, e como na obesidade há alteração da microbiota que é responsável por este processo de absorção, pode haver alterações importantes na expressão de citocinas no intestino.

Primeiramente avaliamos os níveis de citocinas no intestino e a fosforilação de vias pró-inflamatórias e observamos que as mesmas estão diminuídas nos camundongos MyD88 KO obesos, tanto no intestino delgado como no intestino grosso, sugerindo que montar uma resposta inflamatória é essencial para tentar manter a integridade da barreira intestinal.

Como consequência, observamos aumento da permeabilidade intestinal nos camundongos MyD88 obesos, o que corrobora o desenvolvimento da obesidade.

Além disso, o bom funcionamento da barreira intestinal é essencial para evitar a translocação excessiva de moléculas inflamatórias (por exemplo, LPS) para a circulação. Relata-se que a flora pode influenciar a integridade do epitélio intestinal, e na inflamação da mucosa (139, 140), que, por sua vez, pode afetar as propriedades de permeabilidade intestinal. Por isso, a associação entre obesidade e aumento da permeabilidade intestinal foi recentemente sugerida (140). Um alto nível de endotoxinas pode provocar inflamação local ou obter acesso à circulação e induzir inflamação sistêmica através da liberação de citocinas (32). A infusão contínua de endotoxinas ou de um elevado nível de endotoxina induzida por uma dieta rica em gorduras provocou o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina em camundongos (71). Alterações na composição da flora intestinal, também têm sido associadas com a absorção de LPS e aumento da permeabilidade intestinal. Assim, surgiu a ligação entre a microbiota intestinal, aumento da permeabilidade intestinal, endotoxemia e obesidade.

Nossos achados sugerem que MyD88 é essencial para a manutenção da integridade da barreira intestinal e tem um papel importante no desenvolvimento da obesidade a partir da barreira intestinal.

Seguindo no estudo da barreira intestinal, estudamos a expressão de defensinas e peptídeos antimicrobianos, os quais estavam significativamente diminuídos no intestino dos camundongos MyD88 KO, mesmo nos alimentados com dieta padrão. Esse dado contribui com a importância da expressão dessas moléculas para o desenvolvimento da obesidade. Células de Paneth secretam alfa defensinas tais como DEFCR-1 no intestino, bem como outros agentes antimicrobianos, tais como REG III na camada mucosa. Estas células protegem todo o epitélio intestinal

de infecções microbianas e regulam a colonização bacteriana do intestino (98). Alfa defensinas são os produtos mais abundantes secretados pelas células de Paneth (99) e os principais indutores são os produtos de degradação das bactérias do intestino. A sua presença na camada mucosa do epitélio intestinal é constantemente monitorada pelos receptores de reconhecimento de padrões moleculares que são expressos em células de Paneth e enterócitos como TLRs e NLRs (100). As alfa defensinas geram uma resposta anti-inflamatória moderada no intestino suprimindo IL-1 β em resposta ao LPS bacteriano (101). Além desta resposta anti-inflamatória que é benéfica, os microrganismos são capazes de bloquear a expressão de alfa defensinas entéricas e outras substâncias antimicrobianas pelas células de Paneth usando mecanismos ainda desconhecidos, podendo então causar inflamação.

Estudos relataram que camundongos transgênicos para MyD88 no intestino reduziu a expressão de peptídeos antimicrobianos no intestino delgado e o aumento da translocação bacteriana para o linfonodo mesentérico. A sinalização via MyD88 pode fornecer sinais diretos e indiretos para aumentar a produção de fatores antimicrobianos que segregam a microbiota de tecidos do hospedeiro (103).

Um mecanismo potencial para o aumento da susceptibilidade a obesidade que observamos pode ser sugerido pela observação de que os camundongos MyD88 KO falharam em regular a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no intestino, em resposta a dieta. Este achado foi surpreendente, considerando-se que estes fatores são geralmente considerados pró-inflamatórios e sua expressão aumentada têm sido associada a um aumento da gravidade da severidade da síndrome metabólica.

Outro ponto importante na imunidade do intestino são os macrófagos e células dendríticas. Células da lâmina própria CX3CR1⁺ foram definidas como macrófagos, porque eles não têm a capacidade de migrar para os MLNs (84). Portanto estas células são conhecidas como residentes da lâmina própria. Estes

macrófagos contribuem para a homeostase intestinal através do reconhecimento bactérias comensais e produção de citocinas anti-inflamatórias (95). A ausência de CX3CR1 em alguns estudos levou a uma falha no estabelecimento da tolerância oral, em outras palavras, eles não foram eficazes em suprimir as respostas imunes após a exposição a antígenos alimentares.

Por outro lado, as DCs CD11c⁺CD103⁺ atuam como sentinelas. Elas sentem sinais inflamatórios, capturam antígenos luminais e migram para o linfonodo mesentérico para interagir com as células T (89). Essas células apresentam antígenos orais, o que sugere que elas têm origem na lâmina própria. Isto também mostra a importância do transporte constitutivo dos antígenos para o MLNs na manutenção da integridade da mucosa. Sua plasticidade e mobilidade lhes permitem desempenhar múltiplos papéis à medida que avançam a partir da lâmina própria para o epitélio e, posteriormente, para os MLNs (93). Essas células são responsáveis pelo desenvolvimento e expansão extra-tímica de células T reg Foxp3⁺ (92). Considerando-se o papel regulador imunológico chave de células T reg Foxp3⁺, é claro que a sua diferenciação periférica deficiente no intestino pode conduzir a uma falha de tolerância aos antígenos alimentares na mucosa intestinal e tecido linfoide associado ao intestino.

Um estudo demonstrou (97) um papel importante para os macrófagos CX3CR1⁺ da lâmina própria na prevenção da translocação de bactérias comensais para MLNs, estas células limitam respostas Th17 na colite. Camundongos KO para CX3CR1 apresentam número reduzido de macrófagos na lâmina própria e mostrou maior translocação de bactérias comensais para MLNs. Além disso, a gravidade da colite foi aumentada drasticamente nos KOs comparado com os controles. Estas células parecem ser importantes para a proteção contra a inflamação intestinal e a integridade da barreira intestinal.

Observamos diminuída frequência de macrófagos residentes CX₃CR₁⁺ na lâmina própria intestinal dos camundongos MyD88 magros e obesos em relação aos camundongos WT, sugerindo que essas células podem ser importantes para a manutenção da integridade da barreira intestinal impedindo a translocação bacteriana e desenvolvimento da obesidade dependente do aumento de LPS na circulação.

A análise da frequência de células dendríticas CD103⁺ mostrou um aumento na frequência destas células na lâmina própria do intestino grosso, e estão diminuídas nos MLNs e ainda, observamos uma menor ativação destas células através da dupla expressão de CD103 e CD86 nos linfonodos.

Corroborando este dado, observamos uma diminuição significativa na frequência de células T reguladoras FOXP3⁺ no intestino grosso dos camundongos obesos, mas a maior diminuição foi observada nos camundongos MyD88 obesos. A frequência destas células também estava diminuída nos MLNs. Essa menor frequência das células T reguladoras, também pode ser um ponto importante para o aumento da permeabilidade intestinal e desenvolvimento da obesidade independente de MyD88.

O quadro metabólico dos camundongos MyD88 KO também pode estar relacionado com a ausência destas células na lâmina própria intestinal, permitindo um aumento da permeabilidade e maior translocação de LPS, o que exacerbaria a resistência a insulina.

Porém não podemos descartar que a microbiota intestinal de camundongos MyD88 poderia favorecer este fenótipo nos camundongos.

Observamos uma curiosa diferença na microbiota dos camundongos MyD88 KO após a dieta hiperlipídica. Os camundongos apresentaram proporção aumentada de *Firmicutes* se comparados aos camundongos WT na mesma dieta. Isso sugere que

a ausência de MyD88, poderia regular a proporção deste filo bacteriano durante uma dieta hiperlipídica.

Em seres humanos e camundongos, o desenvolvimento da obesidade correlaciona-se com mudanças na abundância relativa dos dois filos dominantes de bactérias no intestino, o *Bacteroidetes* e o *Firmicutes* (2, 67, 141). O diabetes do tipo 2 parece também estar associado a alterações na composição da microbiota do intestino, independente do peso corporal (142). A microbiota intestinal é formada pelo ambiente e pela genética do hospedeiro, sendo que o sistema imune inato, em particular, parece desempenhar um papel-chave na sua regulação (143).

As alterações na microbiota intestinal sugerem que a sinalização via MyD88, provavelmente no intestino, é necessária para proteger contra a expansão anormal de membros específicos da microbiota. Assim, partimos para os estudos de transferência de microbiota intestinal, pois o fenótipo observado favorece um papel para a microbiota intestinal ou até mesmo para o epitélio intestinal no desenvolvimento da obesidade.

Observamos que a microbiota dos camundongos MyD88 KO conferiu um fenótipo de resistência à insulina nos camundongos WT. Ainda, esses camundongos apresentaram uma maior frequência de macrófagos de perfil M1 no tecido adiposo, sugerindo que a microbiota dos camundongos MyD88 é responsável pelo menos em partes pelo fenótipo.

Olhando para o epitélio intestinal, observamos um aumento da permeabilidade intestinal e também maior secreção de citocinas. Conjuntamente, esses resultados nos mostram que a microbiota tem um papel importante no desenvolvimento da obesidade nos camundongos MyD88 KO, porém a resposta que observamos no epitélio intestinal dos camundongos MyD88 KO é diferente do que observamos nos camundongos WT transplantados com a microbiota de MyD88 KO.

Esses camundongos também responderam a dieta hiperlipídica aumentando a permeabilidade intestinal, porém ao contrário dos camundongos MyD88 KO, apresentaram um aumento da inflamação, sugerindo que o epitélio intestinal exerce um importante papel no reconhecimento de antígenos no lúmen intestinal.

A regulação de peptídeos microbianos, por outro lado, parece ser dependente da microbiota dos camundongos MyD88, que similarmente aos KO, estava diminuída. Além disso, a frequência de macrófagos residentes CX3CR1⁺ na lâmina própria estava diminuída nos camundongos transplantados com microbiota de camundongos MyD88 KO. Esse resultado corrobora o que observamos nos camundongos MyD88 KO, sugerindo que a microbiota intestinal dos camundongos MyD88 KO pode modular a frequência dessas células na lâmina própria intestinal.

Com a intenção de entender o desenvolvimento da obesidade e a severa resistência à insulina nos camundongos MyD88 KO mesmo não observando aumento da inflamação clássica, pela expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6, iniciamos a investigação do papel da expressão de MyD88 especificamente no tecido adiposo.

Como observamos uma diminuição na oxidação de glicose nos camundongos MyD88 KO, especulamos se a ausência de MyD88 no tecido adiposo estaria favorecendo o ganho de peso e a resistência à insulina. O que observamos foi que MyD88 não é essencial no tecido adiposo para o desenvolvimento da obesidade. Aparentemente, o fenótipo que observamos nos camundongos MyD88 KO não está associado exclusivamente ao tecido adiposo.

Assim, vale destacar que os macrófagos infiltrantes no tecido adiposo, a microbiota ou o epitélio intestinal, teriam um papel importante nesse processo. Nossos resultados indicam também um papel para os macrófagos nos camundongos MyD88 KO.

Utilizando camundongos nocautes para MyD88 em células mielóides, observamos que esses camundongos são protegidos do desenvolvimento da obesidade sugerindo que a expressão de MyD88 é importante nessas células. Observamos maior frequência de macrófagos de perfil M2 no tecido adiposo e também a permeabilidade intestinal não foi alterada.

Se pensarmos que os macrófagos M1 tem um papel ativo no desenvolvimento da obesidade, indução de Th1 e consequentemente resistência à insulina, a ausência da sinalização via MyD88 nessas células levaria a uma menor ativação e consequentemente menor resistência à insulina.

No entanto, a ausência da inflamação nos camundongos MyD88 KO permanece em questão, visto que os camundongos MyD88 KO desenvolvem severa síndrome metabólica, mas a expressão de MyD88 nos adipócitos não alterou o fenótipo se comparados aos controles. Ainda, a expressão de MyD88 nas células mielóides mostrou-se importante no desenvolvimento da obesidade. No entanto, a depleção é em todas as células de origem mielóide. Macrófagos são as principais células envolvidas no desenvolvimento da obesidade, assumimos que a expressão de MyD88 seria importante nessa população celular.

Uma das explicações poderia ser através da microbiota intestinal. No entanto, a ausência de expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias convencionalmente observadas durante a obesidade nos intrigou a desvendar que outra via de sinalização poderia ser ativada nesses camundongos, o que estaria levando à piora no perfil metabólico.

Associado a obesidade, muitas doenças podem ter seu quadro clínico agravado. Dentre elas, a sepse, na qual a falha do sistema imune pode ser fatal. Nós induzimos sepse polimicrobiana em associação com a obesidade nos camundongos MyD88 KO e WT. Observamos que os camundongos MyD88 KO obesos após 24

horas da sepse falham em secretar citocinas pró-inflamatórias e isso foi associado a um maior crescimento bacteriano na cavidade peritoneal e esse dado corroborou a diminuição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Com esse modelo, nós podemos assumir, pelo menos em partes, que a falha do sistema imune nos camundongos MyD88 KO poderia ser responsável pelo quadro metabólico que observamos.

Continuamos em busca de respostas para as perguntas que surgiram ao longo de nossos estudos, tentando associar o nosso fenótipo com a ativação de possíveis vias de sinalização ainda não mostradas na literatura por ter um papel no desenvolvimento da obesidade.

Investigamos a expressão de dectina-1, uma molécula conhecida pelo seu papel nas respostas imunes contra fungos. Essa molécula parece ser multifuncional, e atua independentemente de TLRs (121). A obesidade e a resistência à insulina é um processo tão complexo, que os ligantes endógenos secretados podem ativar vias de sinalização classicamente envolvidas em outros processos.

O fato de que dectina-1 pode reconhecer células tumorais e desencadear uma resposta imune subsequente ao reconhecimento do tumor (122), nos levou a crer que na ausência de MyD88, esta molécula poderia desempenhar um papel importante no desenvolvimento da obesidade.

Nós observamos um aumento significativo na expressão gênica de dectina-1 no tecido adiposo epididimal dos camundongos MyD88 KO obesos, e além disso, a expressão de SyK, um candidato potencial para iniciar a cascata de sinalização em resposta a ativação de dectina-1 também estava aumentada significativamente.

Dectina-1 é conhecida por reconhecer β -glucana da parede celular de fungos e é expressa por DCs e macrófagos, e a ativação de IRF5 pela via da dectina-SyK tem

sido implicada na indução de interferons do tipo 1, especificamente IFN- β , em infecções fúngicas (144).

Nós observamos um aumento significativo de IRF5 no tecido adiposo epididimal dos camundongos MyD88 KO. Além disso, IRF5 é conhecido como um fator de transcrição para a indução de macrófagos de perfil M1 (145), e nós encontramos a frequência destas células significativamente aumentada nesses camundongos, o que nos sugere que a indução da expressão de dectina-1 estaria ocorrendo nessa população celular em nossos camundongos *full* KO. Nós também encontramos a fosforilação de ERK aumentada no tecido adiposo desses camundongos, o que estaria induzindo uma maior expressão de IRF5.

Além da ativação da via dectina-1-SyK, nós observamos aumento da expressão gênica de IFN- β , possível produto de ativação dessa via, que estava significativamente aumentado nos camundongos MyD88 KO obesos.

Esses resultados nos mostraram um papel para a dectina-1, que até então não foi mostrada no desenvolvimento da obesidade.

Possivelmente a ausência da via inflamatória clássica através da ativação de MyD88, possibilitou a função de uma via independente para a indução da resposta imune e esta corroborou para a severidade da síndrome metabólica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados mostram que a molécula adaptadora MyD88 desempenha um papel crucial para o desenvolvimento da obesidade. Observamos que MyD88 parece ser essencial tanto no intestino, como nas células do sistema imune. Ainda, os sinais desencadeados pela microbiota intestinal desses camundongos podem regular esse processo. Isso lança uma luz sobre os efeitos benéficos da interação intestino/microbiota mediada pela sinalização via MyD88.

A marcada diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias correlacionada com a severidade da síndrome metabólica abre novos horizontes para investigação.

Dessa forma, não descartamos a participação de outras vias de sinalização ativadas na ausência de MyD88, o que poderia explicar pelo menos em partes nosso fenômeno.

O estudo da via da dectina que iniciamos é recente, por isso mais estudos *in vivo* estão sendo realizados para provar nossas hipóteses.

- MyD88 desempenha um papel importante na obesidade e na manutenção de uma resposta imune eficiente;
- A ausência de MyD88 leva a um aumento da resistência à insulina, permeabilidade intestinal, e da frequência de macrófagos de perfil M1 no tecido adiposo;
- A expressão de MyD88 exclusivamente no tecido adiposo não altera o desenvolvimento da obesidade;
- A expressão MyD88 exclusivamente em macrófagos está envolvida no desenvolvimento da obesidade;
- A microbiota intestinal dos camundongos MyD88 KO é suficiente para induzir resistência à insulina em camundongos WT; e
- A via da dectina parece estar relacionada com o desenvolvimento da obesidade através da secreção de IFN- β .

REFERÊNCIAS*

1. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews*. 2001;1(2):135-45.
2. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
3. Spelman K, Burns J, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review*. 2006;11(2):128-50.
4. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 2004;16(1):3-9.
5. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:197-216.
6. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews*. 2009;227(1):221-33.
7. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(16):9237-42.
8. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
9. Shishido T, Nozaki N, Takahashi H, Arimoto T, Niizeki T, Koyama Y, et al. Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;345(4):1446-53.
10. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102(7):2660-9.
11. Park JM, Brady H, Ruocco MG, Sun H, Williams D, Lee SJ, et al. Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes & Development*. 2004;18(5):584-94.

¹ * De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

12. Uehori J, Fukase K, Akazawa T, Uematsu S, Akira S, Funami K, et al. Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *The Journal of Immunology*. 2005;174(11):7096-103.
13. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice*. 2007;4(8):444-54.
14. Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):511-24.
15. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *The Journal of Immunology* 2006;177(10):7155-63.
16. Nyirenda MH, Morandi E, Vinkemeier U, Constantin-Teodosiu D, Drinkwater S, Mee M, et al. TLR2 Stimulation Regulates the Balance between Regulatory T Cell and Th17 Function: A Novel Mechanism of Reduced Regulatory T Cell Function in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology* 2015;194(12):5761-74.
17. Dasgupta G, Chentoufi AA, You S, Falatoonzadeh P, Urbano LA, Akhtarmalik A, et al. Engagement of TLR2 reverses the suppressor function of conjunctiva CD4+CD25+ regulatory T cells and promotes herpes simplex virus epitope-specific CD4+CD25- effector T cell responses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52(6):3321-33.
18. Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Jurnal of Immunology* 2005;175(12):8051-9.
19. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews*. 2008;223(1):20-38.
20. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(11):3015-25.
21. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(8):1986-98.
22. Nammi S, Koka S, Chinnala KM, Boini KM. Obesity: an overview on its current perspectives and treatment options. *Nutrition Journal*. 2004;3:3.
23. World Health Organization . Obesity and overweight. Report. Geneva. 2015; 311:1

24. Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research*. 2003;11(4):525-31.
25. Schaffler A, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Buchler C. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocrine Reviews*. 2006;27(5):449-67.
26. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
27. Juge-Aubry CE, Somm E, Chicheportiche R, Burger D, Pernin A, Cuenod-Pittet B, et al. Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(6):2652-8.
28. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12):1785-8.
29. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes*. 2005;54(12):3458-65.
30. Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2000;24 Suppl 4:S23-7.
31. Greenberg AS, McDaniel ML. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*. 2002;32 Suppl 3:24-34.
32. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
33. Trayhurn P. Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue. *Endocrinology*. 2005;146(3):1003-5.
34. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83(2):461S-5S.
35. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*. 2005;46(11):2347-55.

36. Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(32):24255-63.
37. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology*. 2007;292(3):E740-7.
38. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
39. Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;346(3):739-45.
40. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
41. Chung S, Lapoint K, Martinez K, Kennedy A, Boysen Sandberg M, McIntosh MK. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology*. 2006;147(11):5340-51.
42. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005;54(4):959-67.
43. Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, Tsukumo DM, Velloso LA, Carvalheira JB, et al. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *The Journal of Endocrinology*. 2008;199(3):399-406.
44. Himes RW, Smith CW. Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *Faseb Journal*. 2010;24(3):731-9.
45. Kuo LH, Tsai PJ, Jiang MJ, Chuang YL, Yu L, Lai KT, et al. Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse. *Diabetologia*. 2010;54(1):168-79.
46. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS biology*. 2011;9(12):e1001212.

47. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010;328(5975):228-31.
48. Yokoyama S, Hosoi T, Ozawa K. Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) is a key factor mediating diabetes in MyD88-deficient mice. *Gene*. 2012;497(2):340-3.
49. Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, et al. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metabolism*. 2009;10(4):249-59.
50. Tack CJ, Stienstra R, Joosten LA, Netea MG. Inflammation links excess fat to insulin resistance: the role of the interleukin-1 family. *Immunological Reviews*. 2012;249(1):239-52.
51. Freigang S, Ampenberger F, Weiss A, Kanneganti TD, Iwakura Y, Hersberger M, et al. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1 α and sterile vascular inflammation in atherosclerosis. *Nature Immunology*. 2013;14(10):1045-53.
52. Garcia MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, Hultgren O, et al. Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. *Diabetes*. 2006;55(5):1205-13.
53. Netea MG, Joosten LA, Lewis E, Jensen DR, Voshol PJ, Kullberg BJ, et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nature Medicine*. 2006;12(6):650-6.
54. Aouadi M, Tencerova M, Vangala P, Yaw JC, Nicoloso SM, Amano SU, et al. Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(20):8278-83.
55. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic care*. 2010;13(4):371-6.
56. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual Review of Physiology*. 2010;72:219-46.
57. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12):1796-808.
58. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(1):175-84.

59. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*. 2013;229(2):176-85.
60. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 2010;11(10):889-96.
61. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews*. 2003;3(1):23-35.
62. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004;25(12):677-86.
63. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-48.
64. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):65-80.
65. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8.
66. Lam YY, Ha CW, Hoffmann JM, Oscarsson J, Dinudom A, Mather TJ, et al. Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. *Obesity*. 2015;2(1):10.1002/oby.21122.
67. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(31):11070-5.
68. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005;307(5717):1920-5.
69. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews*. 2004;4(6):478-85.
70. Ishikawa H, Tanaka K, Maeda Y, Aiba Y, Hata A, Tsuji NM, et al. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25⁺ CD4⁺ T cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008;153(1):127-35.
71. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
72. Saito T, Hayashida H, Furugen R. Comment on: Cani et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance: *Diabetes* 56:1761-1772. *Diabetes*. 2007;56(12):e20; author reply e1.

73. Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP. The role of M cells in mucosal immunity. *Cellular and Molecular Life Science*. 2000;57(2):323-32.
74. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *The Journal of Immunology* 2000;164(2):966-72.
75. Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *The Journal of Immunology*. 2006;176(5):3070-9.
76. Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(5):559-70.
77. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007;86(5):1286-92.
78. Hodin CM, Verdam FJ, Grootjans J, Rensen SS, Verheyen FK, Dejong CH, et al. Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *The Journal of Pathology*. 2011;225(2):276-84.
79. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(2):G518-25.
80. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1359-74.
81. Frantz AL, Rogier EW, Weber CR, Shen L, Cohen DA, Fenton LA, et al. Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunology*. 2012;5(5):501-12.
82. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41.
83. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews*. 2008;8(6):411-20.

84. Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*. 2009;31(3):502-12.
85. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews*. 2008;8(6):435-46.
86. Rescigno M. Intestinal dendritic cells. *Advances in Immunology*. 2010;107:109-38.
87. Pabst O, Bernhardt G. The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages. *European Journal of Immunology*. 2010;40(8):2107-11.
88. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *The Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(1):139-55.
89. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*. 2009;31(3):513-25.
90. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(13):3101-14.
91. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(3):519-27.
92. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(8):1757-64.
93. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Forster R, et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005;202(8):1063-73.
94. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner I, Hohl TM, et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity*. 2012;36(2):276-87.
95. Bain CC, Mowat AM. Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment. *European Journal of Immunology*. 2011;41(9):2494-8.

96. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, et al. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*. 2011;34(2):237-46.
97. Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, et al. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(12):4787-95.
98. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjoberg J, Amir E, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature immunology*. 2010;11(1):76-83.
99. Uematsu S, Fujimoto K. The innate immune system in the intestine. *Microbiology and Immunology*. 2010;54(11):645-57.
100. Choi YJ, Im E, Chung HK, Pothoulakis C, Rhee SH. TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;285(48):37570-8.
101. Shi J, Aono S, Lu W, Ouellette AJ, Hu X, Ji Y, et al. A novel role for defensins in intestinal homeostasis: regulation of IL-1 β secretion. *The Journal of Immunology* 2007;179(2):1245-53.
102. Mukherjee S, Vaishnava S, Hooper LV. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cellular and Molecular Life Science*. 2008;65(19):3019-27.
103. Natividad JM, Hayes CL, Motta JP, Jury J, Galipeau HJ, Philip V, et al. Differential Induction of Antimicrobial REGIII by the Intestinal Microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(24):7745-54.
104. Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII γ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(8):1891-900.
105. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB- α ubiquitination. *Science*. 2000;289(5484):1560-3.
106. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell death and differentiation*. 2006;13(5):816-25.
107. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301(5633):640-3.

108. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
109. Konner AC, Bruning JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2011;22(1):16-23.
110. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365(9467):1333-46.
111. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*. 2002;8(11):1288-95.
112. Golubovic MV, Dimic D, Antic S, Radenkovic S, Djindjic B, Jovanovic M. Relationship of adipokine to insulin sensitivity and glycemic regulation in obese women--the effect of body weight reduction by caloric restriction. *Vojnosanitetski Pregled*. 2013;70(3):284-91.
113. Farache J, Zigmond E, Shakhar G, Jung S. Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunology and Cell Biology*. 2013;91(3):232-9.
114. Yaegashi M, Jean R, Zuriqat M, Noack S, Homel P. Outcome of morbid obesity in the intensive care unit. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2005;20(3):147-54.
115. Vachharajani V, Vital S. Obesity and sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2006;21(5):287-95.
116. Hsu A, Aronoff DM, Phipps J, Goel D, Mancuso P. Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007;150(2):332-9.
117. Kaplan JM, Nowell M, Lahni P, O'Connor MP, Hake PW, Zingarelli B. Short-term high fat feeding increases organ injury and mortality after polymicrobial sepsis. *Obesity*. 2012;20(10):1995-2002.
118. Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi EJ, Correa-Silva R, et al. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PloS one*. 2011;7(5):e37584.
119. Sonogo F, Castanheira FV, Czaikoski PG, Kanashiro A, Souto FO, Franca RO, et al. MyD88-, but not Nod1- and/or Nod2-deficient mice, show increased susceptibility to polymicrobial sepsis due to impaired local inflammatory response. *PloS one*. 2014;9(8):e103734.

120. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2001;60(3):329-39.
121. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews*. 2006;6(1):33-43.
122. Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, et al. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *eLife*. 2015;3(1):e04177.
123. Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Sanjuan G, Suzuki Y, Ortega L, et al. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(8):1864-70.
124. Kim SJ, Choi Y, Choi YH, Park T. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(2):113-22.
125. Purohit JS, Hu P, Chen G, Whelan J, Moustaid-Moussa N, Zhao L. Activation of nucleotide oligomerization domain containing protein 1 induces lipolysis through NF-kappaB and the lipolytic PKA activation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2013;91(6):428-34.
126. Ballak DB, van Asseldonk EJ, van Diepen JA, Jansen H, Hijmans A, Joosten LA, et al. TLR-3 is present in human adipocytes, but its signalling is not required for obesity-induced inflammation in adipose tissue in vivo. *PloS one*. 2015;10(4):e0123152.
127. McGee KC, Harte AL, da Silva NF, Al-Daghri N, Creely SJ, Kusminski CM, et al. Visfatin is regulated by rosiglitazone in type 2 diabetes mellitus and influenced by NFkappaB and JNK in human abdominal subcutaneous adipocytes. *PloS one*. 2011;6(6):e20287.
128. Ehse JA, Meier DT, Wueest S, Rytka J, Boller S, Wielinga PY, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia*. 2010;53(8):1795-806.
129. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British Journal of Nutrition*. 2004;92(3):347-55.
130. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*. 2008;29(24):2959-71.

131. Mlinar B, Marc J. New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011;49(12):1925-35.
132. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews*. 2005;5(12):953-64.
133. Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2014;19(3):512-26.
134. Shang Q, Bai Y, Wang G, Song Q, Guo C, Zhang L, et al. Delivery of Adipose-derived Stem Cells Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Obese Mice through Remodeling Macrophage Phenotypes. *Stem Cells and Development*. 2015;4(7):1232-40.
135. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exercise Immunology Review*. 2010;16(1):105-18.
136. Borgeson E, Johnson AM, Lee YS, Till A, Syed GH, Ali-Shah ST, et al. Lipoxin A Attenuates Obesity-Induced Adipose Inflammation and Associated Liver and Kidney Disease. *Cell Metabolism*. 2015;1(15):00215-6.
137. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94.
138. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):298-306.
139. Hausmann M. How bacteria-induced apoptosis of intestinal epithelial cells contributes to mucosal inflammation. *International Journal of Inflammation*. 2010;2010:574568.
140. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *Journal of Parental and Enteral Nutrition*. 2011;35(5 Suppl):14S-20S.
141. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine*. 2009;1(6):6ra14.
142. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Current Microbiology*. 2010;61(1):69-78.

143. Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, Lawson MA, et al. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science*. 2009;325(5940):617-20.
144. del Fresno C, Soulat D, Roth S, Blazek K, Udalova I, Sancho D, et al. Interferon-beta production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. *Immunity*. 2013;38(6):1176-86.
145. Weiss M, Blazek K, Byrne AJ, Perocheau DP, Udalova IA. IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013(1):245804.
146. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine*. 1996;334(5):292-5.

ANEXOS

ANEXO A - Trabalho realizado durante o Doutorado Sanduíche com bolsa BEPE- 1.

Este trabalho recebeu auxílio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP)

Processo: 2014/02218-6

A study of the signaling pathways induced by RBP4 in macrophages in obesity induced insulin resistance

Castoldi A^{1,2*}, Moraes-Vieira PM^{1*}, Aryal P¹, Wellenstein K¹, Peroni O¹, and Kahn BB¹.

* co-first authors

¹Division of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston

²Department of immunology, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Abstract

Adipose tissue (AT) inflammation and impaired insulin action are major cause of type 2 diabetes. RBP4 is an adipocyte- and liver-derived protein that has an important role in insulin resistance, metabolic syndrome and adipose tissue inflammation and emerging evidence suggests a possible role as pro-inflammatory signaling molecule. RBP4 elevation causes AT inflammation by activating innate immunity that elicits an adaptive immune response. Our aims are to determine the signaling pathways involved in RBP4-induced macrophage activation and the resulting antigen presentation and Th1 polarization and whether the blockade of antigen presentation improves adipose tissue inflammation and insulin resistance. RBP4-overexpressing mice (RBP4-Ox) are insulin resistant and glucose intolerant and have increased AT macrophage and Th1 cell infiltration. In RBP4-Ox, adipose tissue macrophages display enhanced JNK, ERK and p38 phosphorylation, and in vitro inhibition of these pathways reduces macrophage activation and macrophage-induced CD4⁺ T cell proliferation and Th1 polarization. Moreover, macrophages obtained from MyD88 knockout mice and activated with RBP4 do not secrete TNF, IL12 and IL-1 β and fail to induce CD4⁺ T cell proliferation and Th1 polarization. Treatment of RBP4-Ox mice with CTLA4-Ig reduces AT inflammation and improves insulin resistance. Furthermore, RBP4 knockout mice are protected from insulin resistance and AT inflammation induced by high fat diet. Thus, RBP4 causes insulin resistance, at least partly, through MyD88 pathway and downstream by activating JNK, ERK, p38 and NF- κ B pathways. These pathways induce macrophage activation and Th1 polarization, which can be blocked by inhibiting antigen presentation with CTLA4-Ig

Introduction

A major cause of type 2 diabetes (T2D) is impaired insulin action in adipose tissue, skeletal muscle and liver. Even in the absence of overt diabetes, insulin resistance is a major risk factor for cardiovascular disease and early mortality (1, 2). Adipocyte-secreted molecules can either enhance (i.g., leptin and adiponectin) or impair (i.g., fatty acids, tumor-necrosis factor (TNF), RBP4 (Retinol binding protein 4) and resistin) insulin action (2, 3). RBP4 levels are elevated in many insulin-resistant states in mice and humans and the manipulation of the levels of RBP4 in the serum affects insulin responses (4-8). RBP4 is the only specific transport protein for retinol (vitamin A) in the circulation and elevation of serum RBP4 causes systemic insulin resistance (4). The RBP4 knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity (4). Many studies showed that serum RBP4 levels correlate with several components of the metabolic syndrome in humans, including hypertension (5) dyslipidemia (7), cardiovascular disease (8), and alterations in intra-abdominal fat mass (8).

Obesity is a state of chronic, low-grade inflammation, and macrophages are thought to play an important role in maintaining this state (9, 10). Other cell types may be important on regulation of AT inflammation and insulin sensitivity, such as dendritic cells (11-13).

AT macrophages accumulate in both the subcutaneous and visceral expanding fat depots, even though macrophage infiltration appears to be more prominent in the latter (14). Apart from increasing in numbers, AT macrophages are also phenotypically changed during obesity: while anti-inflammatory M2 macrophages reside in white adipose tissue (WAT) of lean mice, obese WAT predominantly contains pro-inflammatory M1 macrophages (14). Activated M1 ATMs are a prominent source of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6, which can block insulin action in adipocytes via autocrine/paracrine signaling causing systemic insulin resistance via endocrine signaling. Thus, both recruitment and pro-inflammatory polarization of ATMs are required for the development of insulin resistance (10).

Emerging evidence suggests a possible role for pro-inflammatory pathways in RBP4-induced insulin resistance. RBP4 expression in AT (15) and serum RBP4 levels (16) strongly correlate with subclinical inflammation, including serum levels (16) and AT expression of pro-inflammatory cytokines (15). At the cellular level, RBP4 stimulates

cytokine secretion from mouse macrophages (17). Another study showed that the RBP4/retinol complex stimulates JAK2/STAT5 signaling and expression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (18), which has been implicated in insulin resistance (19). Together, these studies support the notion that RBP4-induced insulin resistance may involve inflammatory pathways. Dr. Kahn lab showed that effects of RBP4 on insulin action can also be retinol independent (20) and that RBP4 impairs insulin signaling in co-cultured adipocytes indirectly, by inducing pro-inflammatory cytokine production from macrophages (20). This effect was mediated, in part, by the Toll-like receptor 4 (TLR4) cell surface receptor and the c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) signaling pathway (20, 21). Moreover, recently Dr. Kahn Lab also showed that activation of AT antigen presenting cells (APCs) by RBP4 is sufficient to induce AT inflammation and insulin resistance (29).

Depending on the signals during the interactions with APCs, CD4⁺ T cells can differentiate into pro- (T helper 1 - Th1 and Th17) or anti-inflammatory (Th2 and regulatory T cells – T reg) cells (22). Obesity is associated with a progressive bias toward a pro-inflammatory Th1 phenotype in adipose tissue, which is linked to insulin resistance (23). Moreover, insulin sensitivity is improved in Th1 lineage-defining transcription factor (T-bet) deficient mice on high fat diet (HFD) despite increased visceral adiposity (24).

The mechanisms that regulate the inflammatory fate of adipose tissue T cells are unknown. CD4⁺ T cells undergo polyclonal expansion within adipose tissue in obesity (25). This implies that adipose tissue CD4⁺ T cell expansion and polarization are an adaptive immune response to obesity and insulin resistance. Classically, APCs shape CD4⁺ T cell activation by three signals which define the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into pro- or anti-inflammatory CD4⁺ T cell subsets: 1) presentation of peptide antigens on major histocompatibility complex class II (MHCII), 2) expression of T cell co-stimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86), and 3) production of cytokines.

Dr. Kahn Lab showed that RBP4 triggers AT inflammation *in vivo*. They observed that elevated RBP4 induces APC activation through the JNK pathway, which results in pro-inflammatory CD4⁺ T cell proliferation and Th1 polarization. This is sufficient to promote systemic insulin resistance (26).

The role of RBP4 in macrophage signaling pathways remains unclear. In this study, we pretend show the effect of RBP4 on the activation of this cells and the role of RBP4-induced pathways in the activation of adaptive immune response leading to the development of obesity.

Currently, many groups have been studying the importance of cell signaling pathways in the development of obesity. It is extremely important that we know the signaling pathways activated in AT macrophages during obesity and insulin resistance in order to create new methods for therapeutic intervention in these pathways, which may contribute to reduce the effects of inflammation in the development of insulin resistance during obesity.

Hypothesis

Since emerging data indicate that a network of cell types are involved in the modulation of the AT immune response, we propose in this project to determine the broader scope of how RBP4 alters macrophages signaling pathways involved in adipose inflammation and insulin resistance by a model of obesity in RBP4 KO mice and by a model of overexpression of RBP4 (RBP4-Ox mice) in lean mice. We hypothesize that RBP4-activated AT macrophage induces adipose tissue “inflammation” (inflammatory cell infiltration and pro-inflammatory cytokine production), triggering critical inflammatory signaling pathways in AT macrophages which will lead to adipose tissue inflammation and insulin resistance by activation of innate immune response and consequently adaptive immune response activation thought Th1 polarization.

Aim

To determine the signaling pathways involved in RBP4-induced macrophage activation and the resulting antigen presentation and Th1 polarization and whether the blockade of antigen presentation improves AT inflammation and insulin resistance.

Methods

Generation of Bone Marrow derived Macrophages (BMDM)

Mouse bone marrow cells will be obtained as previously described (27). M-CSF at a concentration of 50 ng/mL was used for BMDM differentiation. After 7 days of differentiation, these cells were stimulated with RBP4 recombinant at a final concentration of 50 µg/mL.

Recombinant RBP4 preparation

Human RBP4 was expressed in *Escherichia coli* and purified as described previously(4). Endotoxin was removed by sequential affinity adsorption to Endotrap matrix (Hyglos GmbH) and Detoxigel (Pierce). Recombinant RBP4 protein purity was determined by Coomassie staining of SDS-PAGE gels and mass-spectrometry with and without a strong cation exchange cleanup.

Animal studies and measurement of metabolic parameters (ITT and GTT)

Male RBP4-overexpressing (RBP4-Ox) mice on a C57BL6 background were bred with female C57BL6/J mice (Jackson Laboratories) to generate RBP4-Ox mice and control littermates. The RBP4-Ox mice express human-RBP4 under the control of mouse muscle creatine kinase (146) promoter and were extensively characterized (28). 14-19 week old male mice were used for the studies. Also, RBP4 KO mice on a C57BL6 background were bred with female C57BL6/J mice (Jackson Laboratories) to generate RBP4 KO mice and control littermates.

Insulin (ITT) and glucose (GTT) tolerance tests were performed in awake mice after a 5-h fast and a 12-h fast, respectively. Blood glucose was determined with using a One Touch Basic glucometer (Lifescan). Mouse studies were conducted in accordance with federal guidelines. The Institutional Animal Care and Use Committee (Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC), Boston, MA) approved all studies. All studies were performed on age- and sex-matched littermates.

Western blotting

Cells were lysed with RIPA buffer and protease inhibitor. Lysates were subjected to immunoblotting with the indicated antibody. The following antibodies from Cell Signaling were used: p38 (catalog no. 9212), P-p38 (catalog no. 9211), JNK (catalog no. 9252), P-JNK (catalog no. 9251), P-ERK (catalog no. 9101), and ERK (catalog no.

9102), I κ B alpha (catalog no. 9242) and Beta actin from Santa Cruz Biotech (catalog no. sc-47778).

Coculture and T cell proliferation assay

CD4⁺ T cells from the spleen of donor C57B6/J male were purified by magnetic beads as described by the manufacture (Myotecn), stained with Cell Trace (Pacific Blue) (CFSE Life Technologies) and cocultured with BMDM stimulated with RBP4 50 μ g/mL during 18h. 10000 CD4 T cells were cocultures with 500 BMDM. Anti-CD3 was add to the coculture. After 5 days the cells were acquired on specially ordered 5 lasers LSR II flow cytometer (BD Biosciences) at the Beth Israel Deaconess Medical Center Flow cytometry Core and analyzed with FlowJo 9.5.3 software (Treestar).

Flow Cytometry

The adipose tissue stromal vascular fraction or BMDM cells were re-suspended in PBS supplemented with 2% FCS and surface markers were stained with monoclonal antibody for multicolor flow cytometry. For intracellular cytokine staining, cells were stained as previously described (29). The cells were acquired on specially ordered 5 lasers LSR II flow cytometer (BD Biosciences) at the Beth Israel Deaconess Medical Center Flow cytometry Core and analyzed with FlowJo 9.5.3 software (Treestar).

Inhibitors

To the inhibition of signaling pathways were used p38 inhibitor (SB203580, 10 μ M), ERK inhibitor (PD032591, 10 μ M), JNK inhibitor (JNK inhibitor II, 5 μ M), and NF κ B inhibitor (Bay11-7082, 10 μ M) 30 min before RBP4 50 μ g/mL.

ELISA

The levels of secreted cytokines in culture medium were measured by ELISAs from Biolegend (TNF- α , catalog no. 430905; IL-6, catalog no. 431305; and IL-12, catalog no. 431602).

Results and discussion

Stimulation of BMDM with RBP4 induces activation of p38, JNK, ERK and NF κ B signaling pathways

The hypothesis that RBP4-induced insulin resistance may involve inflammatory pathways is true observing the effects of RBP4 at the cellular level.

Previous data published in the lab showed that RBP4 (50 μ g/ml for 24 h) at a concentration present in serum of some insulin-resistant humans induces markedly increased TNF- α , IL-6, and MCP-1 secretion in several types of macrophages such as RAW264.7, peritoneal macrophages and BMDM. However, the signaling pathways activated by RBP4 in macrophages are still not very well clarified. In order to answer this question, we stimulated BMDM with RBP4 (50 μ g/ml) during 15 and 30 minutes and without stimulation as immature macrophage. We also know from ongoing work in the lab that RBP4 activate macrophages through TLR activation and we believe that MyD88 plays an important role during this process. We observed that RBP4 induces increased phosphorylation of ERK, p38, NF κ B and JNK (26) signaling pathways indicating activation of these pathways (**Figure 1**), all downstream molecules of adapter molecule MyD88. Here, we demonstrate that RBP4 induces activation of BMDM by induction of activation of pro-inflammatory signaling pathways ERK, JNK, p38 and NF κ B and it occurs possibly through MyD88 activation.

Figure 1 - Western blotting analysis of pathways activated by RBP4 in bone marrow derived macrophages (BMDM) from WT mice after 15 and 30 minutes of stimulation; LPS was used as positive control; iMac = immature macrophage.

In vitro inhibition of p38, ERK, JNK and NFκB pathways reduces BMDM activation

Since we know that RBP4 induces secretion of pro-inflammatory cytokines through activation of JNK, p38, ERK and NFκB signaling pathways, we were interested to know whether the inhibition of these signaling pathways might inhibit activation of BMDM. All inhibitors were used 30 minutes before RBP4 stimulation. We observed that the inhibition of JNK, p38, ERK and NFκB using JNK inhibitor II, SB20358010, PD032591 and Bay11-7082 respectively, when used alone, it decreased secretion of IL-6, TNF-α and IL-12 by BMDM stimulated with RBP4 after 18 hours (**Figure 2**). However the combination of inhibitors, mainly when we used NFκB inhibitor combined with JNK, p38 and ERK inhibitors it was more efficient to inhibit pro-inflammatory cytokines secretion.

Since we observed decreased pro-inflammatory cytokines secretion including IL-12 that is secreted by BMDM after activation and it is responsible to induces IFN-γ secretion by CD4 T cells, we went to see the expression of co-stimulatory molecules in BMDM after 18 hours of stimulation with RBP4.

Figure 2 - BMDM were treated 30 minutes prior RBP4 stimulation with p38 inhibitor (SB203580, 10 μ M), ERK inhibitor (PD032591, 10 μ M), JNK inhibitor (JNK inhibitor II, 5 μ M), and NF κ B inhibitor (Bay11-7082, 10 μ M) and ELISA for IL-6, TNF and IL-12 cytokine secretion were performed in the cell culture media. Values are means $\pm$ standard deviation * versus all other groups; # vs iMac.

We observed decreased surface expression of CD40, CD86, CD80 and MHCII 18 hours after treatments (**Figure 3**) when the cells were treated with the inhibitors for 30 minutes prior to RBP4 stimulation. Again, the combination of inhibitors was efficient to inhibit activation. The best effect was observed in CD40 and CD86 expression. Here we showed that the activation of these signaling pathways is necessary for activation of BMDM by RBP4 and consequently secretion of pro-inflammatory cytokines that in obesity context will collaborate to increase systemic insulin resistance.

Figure 3 - Flow cytometry of CD40, CD86, MHCII and CD80 expression in BMDM treated 30 minutes prior RBP4 stimulation with p38 inhibitor (SB203580, 10 μ M), ERK inhibitor (PD032591, 10 μ M), JNK inhibitor (JNK inhibitor II, 5 μ M), and NF κ B inhibitor (Bay11-7082, 10 μ M). Here we are showing MFI (Median of fluorescence intensity) of each marker. Values are means $\pm$ standard deviation * versus all other groups; # vs iMac.

Inhibition of p38, ERK, JNK and NF κ B pathways reduces BMDM activation, macrophage-induced CD4⁺ T cell proliferation and Th1 polarization

During obesity, elevation of RBP4 results in greater inflammation in adipose tissue and the innate immune system (macrophages) is activated and as we observed, it increases secretion of cytokines that will lead to the activation of adaptive immune response which amplifies the inflammation culminating in systemic insulin resistance. As we showed, RBP4 induces activation of BMDM by induction of activation of p38, ERK, JNK and NF κ B signaling pathways, our next step was to study if activation of these signaling pathways in macrophages is necessary for activation of CD4⁺ T cells by RBP4. We observed that the inhibition of these pathways in BMDM was able to decrease CD4⁺ T cell proliferation (**Figure 4**). As we know, activation of innate immunity is important to start the immune response during obesity. RBP4 is recognized by TLRs and might start activation of inflammatory pathways by MyD88 activation, culminating in pro-inflammatory cytokines secretion and amplification of immune response by activation of adaptive immune response through Th1 polarization.

Since RBP4 induces CD4⁺ T cell proliferation and obesity is correlated with Th1 polarization, we intended to know if the inhibition of these signaling pathways is associated with Th1 polarization induced by RBP4. We observed decreased secretion of IFN- γ after coculture of BMDM treated with inhibitors 30 minutes before 18 hours of stimulation with RBP4 if we compare to BMDM only treated with RBP4 (**Figure 5**). The inhibition of these signaling pathways also increased secretion of IL-4, an anti-inflammatory cytokine in the adipose tissue environment.

During obesity, activation of the immune system, mainly macrophages, by RBP4 appears to be dependent of MyD88 since we observed the role of downstream signaling pathways during RBP4 activation of BMDM culminating in activation of Th1 immune response what will increase insulin resistance. To confirm this hypothesis we decided to derive BMDM from MyD88 KO mice.

Figure 4 - The BMDM treated with inhibitors for ERK, p38, JNK and NFκB prior to RBP4 stimulation. Next, purified CD4 T cells were cocultured with BMDM treated in different conditions. Proliferation Index was calculated with FlowJo software. Values are means ± standard deviation * versus all other groups; # vs iMac.

Figure 5 - The BMDM treated with inhibitors for ERK, p38, JNK and NF κ B prior to RBP4 stimulation. Next, purified CD4 T cells were cocultured with BMDM treated in different conditions IFN γ and IL-4 cytokine secretion was analyzed in the coculture media. Values are means $\pm$ standard deviation * versus all other groups; # vs iMac.

MyD88 regulates RBP4-induced BMDM activation, TNF, IL-6 and IL-12 secretion, induction of CD4 T cell proliferation and Th1 polarization

Since we observed activation of pro-inflammatory signaling pathways, all downstream of MyD88, we started to study if the absence of MyD88 will affect activation of adaptive immune response after RBP4 stimulation.

First, we analyzed whether the absence of MyD88 decreases activation of these signaling pathways after RBP4 stimulation. We observed that BMDM from MyD88 KO mice had decreased activation of p38, ERK, JNK, and NF κ B signaling pathways after 15 and 30 minutes (**Figure 6**) of RBP4 treatment compared to WT BMDM. This result shows that activation of macrophages by RBP4 is dependent on MyD88 and consequently requires the downstream signaling pathways. To confirm it, we analyzed pro inflammatory cytokine secretion by MyD88 KO BMDM after 18 hours of RBP4 stimulation. We observed significantly decrease of TNF- α , IL-6 and IL-12 secretion in the cell culture media (**Figure 7**).

Figure 6 - Western blotting analysis of pathways activated by RBP4 in BMDM from WT and MyD88 KO mouse and immature macrophage (iMac). * versus all other groups # versus WT at the same time of RBP4 stimulation.

Figure 7 - Analysis of IL-6, TNF and IL-12 cytokine secretion into the media by RBP4-activated macrophages after 18 hours. Values are means $\pm$ standard deviation. * versus all other groups # versus WT at the same time of RBP4 stimulation.

Since MyD88 regulates pro-inflammatory cytokines secretion, we were interested to know if surface expression of activation markers is also dependent on MyD88. As showed on **figure 8**, we observed that the absence of MyD88 was able to decrease expression of CD40, CD80, CD86 and MHCII expression under RBP4 stimulation. In addition, the expression of these surface markers will culminate in activation of adaptive immune response, so our next step was to study whether the induction of adaptive immune response by RBP4 during obesity is dependent on MyD88 activation. Performing a coculture assay, we observed that the absence of MyD88 in BMDM decreases proliferation index of WT CD4 T cells (**Figure 9**) and consequently decreases secretion of IFN- γ by this coculture and increased IL-4 secretion (**Figure 10**). Based on these results we might conclude that RBP4 activates adaptive immune response during obesity through MyD88 signaling pathway and the activation of Th1 immune response may amplify the inflammatory process and it can be responsible by inducing insulin resistance.

Figure 8 - Expression CD40, CD86, MHCII and CD80 in RBP4-activated BMDM after 18 hours analyzed by flow cytometry. Values are means $\pm$ standard deviation. * versus all other groups # versus WT at the same time of RBP4 stimulation.

Figure 9 - Proliferation Index of CD4 T cells co-culture with RBP4-activated BMDM. Values are means $\pm$ standard deviation. * versus all other groups # versus WT at the same time of RBP4 stimulation.

Figure 10 - IFN γ and IL-4 cytokine secretion in the co-culture. Values are means $\pm$ standard deviation. * versus all other groups # versus WT at the same time of RBP4 stimulation.

RBP4 knockout mice are protected from insulin resistance and adipose tissue inflammation induced by High Fat Diet (HFD)

Since RBP4 induces activation of BMDM and adipose tissue macrophages activation is sufficient to induce CD4 T cell proliferation (30), we evaluated the role of RBP4 inducing insulin resistance and changing macrophage profile and activation during obesity induced by HFD. We observed that RBP4 knockout mice are partially protected from insulin resistance if we compare to WT mice after 4 months on HFD (**Figure 11**).

In obesity and other insulin resistance states, adipose tissue macrophage polarization spans a spectrum of markers to define pro- and anti-inflammatory macrophages. Pro-inflammatory adipose tissue macrophage which express CD11c+ (used as a marker for classically activated, also called M1 macrophages) are generally increased leading to inflammation-induced insulin resistance(31). This results in a reduction in the relative number of CD206+ macrophages (alternatively-activated or M2 macrophages) which are predominantly anti-inflammatory (32).

Figure 11 - Insulin tolerance test (ITT) in WT and RBP4 KO mice on Chow and HFD; AAC = Area above the curve. Values are means $\pm$ standard deviation. * vs all other groups; ^a vs WT on HFD.

We were interested to know if the absence of RBP4 although of decreases systemic insulin resistance will be able to decreases M1 macrophages infiltration into the adipose tissue of these mice. We observed that the absence of RBP4 decreases infiltration of F480+CD11b+ cells into the adipose tissue, as well after 4 months on HFD, these mice showed decreased infiltration of M1 macrophages (F480+CD11b+CD11c+) into the adipose tissue compared to WT mice. We did not see differences on M2 macrophage infiltration comparing WT and RBP4 KO mice (**Figure 12**).

In addition to insulin resistance protection and M1 macrophage infiltration decreased, we observed decreased pro-inflammatory cytokines secretion by adipose tissue macrophages in RBP4 KO mice. We observed decreased of TNF- α and IL-1 β secretion by these cells(**Figure 13**).

Accumulation of adipose tissue macrophage is only part of the immune response that causes insulin resistance. T cells are also recruited to adipose tissue during the development of obesity-related insulin resistance (23, 33). We are interested to know if RBP4 is sufficient to induce T cell recruitment, activation and antigen presentation by these cells culminating in development of insulin resistance.

Figure 12 - Flow cytometry plots of adipose tissue macrophage (ATM), Number of total ATM (F4/80+CD11b+), Number of M1 ATM (F4/80+CD11b+CD11c+), Number of M2 ATM m (F4/80+ Cd11b+CD206+) respectively. Values are means $\pm$ standard deviation. * vs all other groups; # vs RBP4 KO on Chow diet.

Figure 13 - Flow cytometry plots of ATM positive for TNF and IL-1 β and Percentage of ATM positive for TNF and IL-1 β . Values are means $\pm$ standard deviation. * vs all other groups; # vs RBP4 KO on Chow diet.

Treatment of mice overexpressing RBP4 (RBP4-Ox) with CLTA4-Ig reduces AT inflammation and improves insulin resistance

Previously, Dr. Kahn Lab showed that RBP4-overexpressing mice (RBP4-Ox) are insulin-resistant and glucose-intolerant and have increased adipose tissue macrophage and CD4 T-cell infiltration. Here, we are interested to know if the activation of adaptive response through Th1 polarization of lymphocytes is sufficient to induce insulin resistance in RBP4-Ox mice.

To answer this question we used RBP4-Ox mice fed on chow diet. After 14 weeks they are glucose-intolerant and insulin resistant with normal body weight, fat mass,

serum triglycerides, free fatty acids and adiponectin (26). We used CTLA4-Ig that is a fusion protein of the extracellular domain of CTLA4 and IgG1 that binds to both CD80 and CD86 (also referred to as B7-1 and B7-2, or collectively as B7 proteins) and prevents interaction of B7 proteins with their counter receptors CD28 and CTLA4 expressed on T cells (34). Using this molecule, we can inhibit activation of adaptive immune response by our molecule, RBP4.

We treated WT and RBP4-Ox mice with CTLA4-Ig 10 mg/Kg, 3 times a week during 6 weeks and we observed that the treatment improves glucose sensitivity and insulin tolerance (**Figure 14**).

△ WT ● WT CTLA4-Ig ● RBP4-Ox ■ RBP4-Ox CTLA4-Ig

Figure 14 - Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) in WT and RBP4-Ox mice treated with PBS or CTLA4-Ig (10 mg/Kg, 3 times a week for 6 weeks). Values are means $\pm$ standard deviation. * versus all other groups.

As expected since we observed increased insulin sensitivity after treatment with CTLA4-Ig, we also observed decreased number of total macrophages (F480+CD11b+) and decreased number of M1 macrophages (F480+CD11b+CD11c+)

into the adipose tissue in RBP4 Ox mice treated with CTLA4-Ig, and we did not see differences when analyzed M2 macrophages (F4/80+CD11b+CD206+) (**Figure 15**). The development of insulin resistance and glucose intolerance induced by over expression of RBP4 appears to be dependent on activation of adaptive immune response and thus, we went to see how was the activation of CD4 T cells in the adipose tissue of these mice after CTLA4-Ig treatment. We observed that the total number of activated CD4 T cells by analyzing CD69 expression was decreased after treatment even in the WT mice compared to PBS treated control mice (**Figure 16**).

Figure 15 - Flow cytometry plots of ATM, Number of total ATM (CD45+F4/80+CD11b+), Number of M1 ATM (F4/80+CD11b+CD11c+), Number of M2 macrophages (F4/80+CD11b+CD206+) respectively. Values are means $\pm$ standard deviation. * versus all other groups, # versus WT treated with CTLA4-Ig.

Analyzing pro-inflammatory cytokines secretion by CD4 T cells, we observed that CTLA4-Ig treatment decreased secretion of TNF- α and IFN- γ by RBP4-Ox mice.

As we observed, RBP4 induces activation of immune system, specifically macrophages requiring MyD88 signaling pathway and the downstream pathways culminating in pro-inflammatory cytokines secretion, recruitment of CD4 T cells, activation and proliferation and consequently increasing insulin resistance.

Figure 16 - Flow cytometry plots of AT CD4⁺CD69⁺ T cell; Total number of AT CD4 T cell and CD4 CD69 T cell. Values are means $\pm$ standard deviation. * versus all other groups, # versus WT treated with CTLA4-Ig, & as indicated, @ Versus PBS control groups (WT or RBP4-Ox), a versus WT PBS (T-test).

Figure 17 - Flow cytometry plots of AT CD4 T cells positive for TNF and IFN- γ , Number of AT CD4 T cell positive for TNF and IFN- γ . Values are means $\pm$ standard deviation. * versus all other groups, # versus WT treated with CTLA4-Ig, & as indicated, @ Versus PBS control groups (WT or RBP4-Ox), a versus WT PBS (T-test).

Conclusion

RBP4 activates macrophage athrough MyD88 pathway and downstream by activating JNK, ERK, p38 and NFkB. RBP4 activation of these pathways are necessary to induce macrophage activation and Th1 polarization. In vivo, CTLA4-Ig treatment is sufficient to reduce adipose tissue inflammation and insulin resistance.

References

1. Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(30):22243-6.
2. Moraes-Vieira PM, Bassi EJ, Araujo RC, Camara NO. Leptin as a link between the immune system and kidney-related diseases: leading actor or just a coadjuvant? *Obes Rev*. 2012.
3. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14 Suppl 5:242S-9S.

4. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005;436(7049):356-62.
5. Qi Q, Yu Z, Ye X, Zhao F, Huang P, Hu FB, et al. Elevated retinol-binding protein 4 levels are associated with metabolic syndrome in Chinese people. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(12):4827-34.
6. Solini A, Santini E, Madec S, Rossi C, Muscelli E. Retinol-binding protein-4 in women with untreated essential hypertension. *American journal of hypertension*. 2009;22(9):1001-6.
7. Yang Q, Eskurza I, Kiernan UA, Phillips DA, Bluher M, Graham TE, et al. Quantitative measurement of full-length and C-terminal proteolyzed RBP4 in serum of normal and insulin-resistant humans using a novel mass spectrometry immunoassay. *Endocrinology*. 153(3):1519-27.
8. Ingelsson E, Sundstrom J, Melhus H, Michaelsson K, Berne C, Vasan RS, et al. Circulating retinol-binding protein 4, cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease in elderly. *Atherosclerosis*. 2009;206(1):239-44.
9. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:219-46.
10. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1796-808.
11. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6026):243-7.
12. Chatzigeorgiou A, Karalis KP, Bornstein SR, Chavakis T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia*. 2012.
13. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, et al. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature*. 2012;486(7404):549-53.
14. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*. 72:219-46.
15. Yao-Borengasser A, Varma V, Bodles AM, Rasouli N, Phanavanh B, Lee MJ, et al. Retinol binding protein 4 expression in humans: relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(7):2590-7.
16. Balagopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D. Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(5):1971-4.
17. Deng ZB, Poliakov A, Hardy RW, Clements R, Liu C, Liu Y, et al. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2009;58(11):2498-505.
18. Berry DC, Jin H, Majumdar A, Noy N. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(11):4340-5.
19. Lebrun P, Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2008;192(1):29-36.
20. Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, Aryal P, et al. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol*. 2012;32(10):2010-9.
21. Pedro M. Moraes-Vieira MMY, Peter M. Dwyer, Ismail Syed, Pratik Aryal, Kahn aBB. RBP4 activates antigen-presenting cells leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell metabolism*. 2014;in press.
22. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
23. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature medicine*. 2009;15(8):921-9.
24. Stolarczyk E, Vong CT, Perucha E, Jackson I, Cawthorne MA, Wargent ET, et al. Improved insulin sensitivity despite increased visceral adiposity in mice deficient for the immune cell transcription factor T-bet. *Cell metabolism*. 17(4):520-33.
25. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol*. 185(3):1836-45.

26. Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell metabolism*.19(3):512-26.
27. Moraes-Vieira PM, Bassi EJ, Larocca RA, Castoldi A, Burghos M, Lepique AP, et al. Leptin deficiency modulates allograft survival by favoring a Th2 and a regulatory immune profile. [corrected]. *Am J Transplant*.13(1):36-44.
28. Quadro L, Blaner WS, Hamberger L, Van Gelder RN, Vogel S, Piantedosi R, et al. Muscle expression of human retinol-binding protein (RBP). Suppression of the visual defect of RBP knockout mice. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(33):30191-7.
29. Moraes-Vieira PM, Larocca RA, Bassi EJ, Peron JP, Andrade-Oliveira V, Wasinski F, et al. Leptin deficiency impairs maturation of dendritic cells and enhances induction of regulatory T and Th17 cells. *European journal of immunology*.44(3):794-806.
30. Morris DL, Cho KW, Delproposto JL, Oatmen KE, Geletka LM, Martinez-Santibanez G, et al. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4+ T cells in mice. *Diabetes*.62(8):2762-72.
31. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):175-84.
32. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2009;58(11):2574-82.
33. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine*. 2009;15(8):930-9.
34. Deppong CM, Bricker TL, Rannals BD, Van Rooijen N, Hsieh CS, Green JM. CTLA4Ig inhibits effector T cells through regulatory T cells and TGF-beta. *J Immunol*.191(6):3082-9.

ANEXO B - Trabalho realizado durante o Doutorado Sanduíche com bolsa BEPE- 2.

Este trabalho recebeu auxílio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo: 2014/02218-6

Retinol Binding Protein 4 (RBP4) activates macrophages by reprogramming their metabolism

Castoldi A^{1,2*}, Moraes-Vieira PM^{1*}, Aryal P¹ and Kahn BB¹.

* co-first authors

¹Division of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston

²Department of immunology, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

RBP4 is an adipocyte- and liver-secreted protein that has an important role in insulin resistance, metabolic syndrome and adipose tissue inflammation. RBP4 elevation causes adipose tissue inflammation by activating the innate immune response, which elicits an adaptive immune response. The molecular mechanism by which RBP4 activates immune responses is not known. During activation, immune cells undergo metabolic reprogramming to support growth and synthesis of macromolecules such as cytokines, chemokines and co-stimulatory receptors. This is mediated by increased expression of genes involved in glycolysis, which appears to result from induction of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α). Furthermore, HIF-1 α in adipocytes regulates systemic insulin sensitivity and glucose metabolism. Our aim is to determine whether the pro-inflammatory effects of elevated RBP4 in obesity and insulin resistance are mediated by metabolic reprogramming of macrophages and if this is regulated by induction of HIF-1 α expression. We observed, *in vitro*, that RBP4-mediated macrophage activation involves increased glycolytic rate, which is necessary for pro-inflammatory cytokine secretion. Our data suggest this process is, at least in part, dependent on HIF-1 α . During HFD-fed conditions, adipose tissue pro-inflammatory macrophages showed increased HIF-1 α expression, glycolysis and pro-inflammatory cytokine expression. This is partially dependent on RBP4, since we observed decreased insulin resistance, adipose tissue inflammation and HIF-1 α expression in adipose tissue macrophages in HFD-fed RBP4 knockout mice. These data indicate that RBP4 activates macrophages through metabolic reprogramming, which is required for pro-inflammatory cytokine secretion and inflammation-induced insulin resistance.

The results from this project were presented by the student on March 3rd during the Endocrinology Division Meeting / Harvard Medical School.

ANEXO C - Trabalho realizado durante o Doutorado Sanduíche com bolsa BEPE- 3.

Trabalho realizado em colaboração com os membros do laboratório (Dr. Kahn's Lab).

Este trabalho recebeu auxílio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo: 2014/02218-6

Anti-inflammatory branched fatty acid esters of hydroxyl fatty acids (FAHFAs) attenuate dextran-sodium sulfate-induced colitis in mice

J. Lee^{1*}, P. M. Moraes-Vieira^{1*}, A. Castoldi^{1,2}, C. Vickers¹, A. Saghatelian¹, B. B. Kahn¹
*contributed equally

¹Division of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston

²Department of immunology, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Ulcerative colitis (UC) is characterized by chronic immune-mediated inflammation of the colon. Studies using oral dietary supplementation of anti-inflammatory n-3 polyunsaturated fatty acids to ameliorate the hallmark pathology and disease activity associated with experimental colitis in mice are inconclusive. We recently discovered a new family of endogenous lipids, branched fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFAs), with anti-inflammatory effects on macrophages in white adipose tissue of obese, insulin-resistant mice and on bone marrow derived dendritic cells in vitro. The aim of this study was to determine whether the FAHFA isomers of palmitic-acid-hydroxy-stearic-acid (PAHSA) with the ester bond at carbons 5- and 9- have therapeutic potential to delay or reduce the severity of colitis in mice. Methods: Male, C57bl6 mice were pre-treated by daily oral gavage for 3 days with vehicle (50% PEG-400:0.5% Tween-80:49.5% Water) or a combination of 5-PAHSA (10mg/kg per day) and 9-PAHSA (5mg/kg per day) before adding simultaneous treatment with 2%-dextran-sodium sulfate (DSS) for 10 days. Body weight and clinical colitis score were measured daily. At day 10, colon length was measured and mononuclear lamina propria cells were harvested for flow cytometry. Results: Body weight loss was reduced with PAHSA treatment ($22.2g \pm 0.31$) compared to vehicle ($19.6g \pm 1.14$, $p < 0.05$) treated mice. Clinical colitis score was reduced 50% in PAHSA-treated mice compared to control mice by day 10 of DSS-water exposure. Colon length was reduced >20% in control mice compared to PAHSA-treated mice. This clinical improvement was associated with reduced pro-inflammatory Th1 cells ($CD4^+IFN-\gamma^+$) in the colon in PAHSA-treated mice and decreased expression of pro-inflammatory cytokines. Conclusions: Oral delivery of PAHSAs is effective in reducing the severity and delaying the onset of DSS-induced colitis in mice via reduced induction of Th1-cells ($CD4^+IFN-\gamma^+$) and may serve as a potential therapeutic agent to ameliorate inflammation-induced gut injury.

ANEXO D - Manuscritos publicados, aceitos para publicação e submetidos durante o doutorado.

-MANUSCRITOS PUBLICADOS NESTE PRÍODO

Gut Bacteria Products Prevent AKI Induced by Ischemia-Reperfusion. Vinicius Andrade-Oliveira, Mariane T Amano, Matheus Correa-Costa, Angela Castoldi, Raphael J F Felizardo, Danilo C de Almeida, Enio J Bassi, Pedro M Moraes-Vieira, Meire I Hiyane, Andrea C D Rodas, Jean P S Peron, Cristhiane F Aguiar, Marlene A Reis, Willian R Ribeiro, Claudete J Valduga, Rui Curi, Marco Aurelio Ramirez Vinolo, Caroline M Ferreira, Niels Olsen Saraiva Câmara, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2015, doi:10.1681/ASN.2014030288

Transthyretin Antisense Oligonucleotides Lower Circulating RBP4 Levels and Improve Insulin Sensitivity in Obese Mice. Laura Zeman, Sanjay Bhanot, Odile D Peroni, Susan F Murray, Pedro M Moraes-Vieira, Angela Castoldi, Prasad Manchem, Shuling Guo, Brett P Monia, Barbara B Kahn, *Diabetes*, December 2014 doi: 10.2337/db14-0970.

Long-Term Aerobic Exercise Protects against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Modulating the Expression of IL-6 and HO-1. Mariana Yasue Saito Miyagi, Marilia Seelaender, Angela Castoldi, Danilo Candido de Almeida, Aline Villa Nova Bacurau, Vinicius Andrade-Oliveira, Lucas Maceratesi Enjiu, Marcus Pisciotto, Caroline Yuri Hayashida, Meire Ioshie Hiyane, Patricia Chakur Brum, Niels Olsen Saraiva Camara, Mariane Tami Amano, *Plos One*, October 2011 doi: 10.1371/journal.pone.0108543

The intestinal barrier: a gentlemen's agreement between microbiota and immunity. Andrea Moro Caricilli^{1*}, Angela Castoldi^{1*}, Niels Olsen Saraiva Câmara^{1,2} *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* * Os dois autores colaboraram igualmente para o manuscrito. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014 February, doi: 10.4291/wjgp.v5.i1.18

Activation of platelet-activating factor receptor exacerbates renal inflammation and promotes fibrosis. Matheus Correa Costa, Vinicius Andrade-Oliveira, Tarcio Braga, Angela Castoldi, Cristhiane Aguiar, Clarice Origassa, Andrea Rodas, Meire Hiyane, Denise Malheiros, Francisco Rios, Sonia Jancar, Niels Camara *Laboratory Investigation*, February 2014 doi:10.1038/labinvest.2013.155

Kinin B1 Receptor Deficiency Attenuates Cisplatin-induced Acute Kidney Injury by Modulating Immune Cell Migration. Gabriel Rufino Estrela, Frederick Wasinski, Danilo Almeida, Mariane Amano, Angela Castoldi, Carolina Dias; Denise eMalheiros, Sandro Almeida, Edgar Julian Paredes-Gamero; João Bosco Pesquero, Carlos Barros, Niels Camara, Ronaldo Araujo, *Journal of Molecular Medicine* Dec 2013 DOI 10.1007/s00109-013-1116-z

TLR2, TLR4 and the MYD88 Signaling Pathway Are Crucial for Neutrophil Migration in Acute Kidney Injury Induced by Sepsis. Angela Castoldi, Tarcio Teodoro Braga, Matheus Correa-Costa, Cristhiane Fávero Aguiar, Enio José Bassi, Reinaldo Correa-Silva, Rosa Maria Elias, Fábila Salvador, Pedro Manoel Moraes-Vieira, Marcos Antônio Cenedeze, Marlene Antônia Reis, Meire Ioshie Hiyane, Álvaro Pacheco-Silva, Giselle Martins Gonçalves, Niels Olsen Saraiva Câmara. *Plos One*, May 2012, Volume 7, Issue 5, e37584

MyD88 Signaling Pathway is Involved in Renal Fibrosis by favoring a TH2 Immune Response and Activating Alternative M2 Macrophages.

Tarcio Teodoro Braga, Matheus Correa-Costa, Yuri Felipe Souza Guise, AngelaCastoldi, Cassiano Donizetti de Oliveira, Meire IoshieHyane, Marcos Antonio, Simone Aparecida Teixeira Cenedeze, Marcelo Nicolas Muscara, Katia Regina, Iolanda MideaCuccovia Perez, Alvaro Pacheco-Silva, Giselle Martins Gonçalves, Niels Olsen Saraiva Camara. *MolMed* 18 : 1231 - 1239, 2012

Low-Level Laser Therapy Decreases Renal Interstitial Fibrosis. Fabiana Aparecida Mayrink Oliveira, Ana Carolina Meneghin Moraes, Amanda Povia Paiva, Vânia Schinzel, Matheus Correa-Costa, Patricia Semedo, AngelaCastoldi, Marcos AntonioCenedeze, Roberto Sotto-Maior Fortes Oliveira, Marcus Gomes Bastos, Niels Olsen Saraiva Câmara, HeladySanders-Pinheiro. *Photomedicineand Laser Surgery*, Volume: 30 Issue 12: November 26, 2012

Leptin Modulates Allograft Survival by Favoring a Th2 and a Regulatory Immune Profile. PMM Moraes-Vieira, EJ Bassi, RA Larocca, A Castoldi, M Burghos, AP Lepique, FJ Quintana, RC Araujo, AS Basso, TB Strom, NOS Câmara. *American Journal of Transplantation*, Article first published online: 27 SEP 2012 | DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04283.x

Oxidative Stress and Modification of Renal Vascular Permeability Are Associated with Acute Kidney Injury during P. berghei ANKA Infection. Rosa Maria Elias, Matheus Correa-Costa, Claudiene Rodrigues Barreto, Reinaldo Correia Silva, Caroline Y Hayashida, AngelaCastoldi, Giselle Martins Gonçalves, Tarcio Teodoro Braga, Renato Barboza, Francisco José Rios, Alexandre Castro Keller, Marcos AntonioCenedeze, Meire IoshieHyane, Maria Regina D'Império-Lima, Antônio Martins Figueiredo-Neto, Marlene Antônia Reis, Cláudio Romero Farias Marinho, Alvaro Pacheco-Silva, Niels Olsen Saraiva Câmara. *PloS One* August 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0044004

-MANUSCRITOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO NESTE PRÍODO

They must hold tight: junction proteins, microbiota and immunity in intestinal mucosa. Angela Castoldi, Cristhiane Favero de Aguiar, Pedro Manoel Moraes Vieira, Niels Olsen Saraiva Câmara *Current Protein & Peptide Science*

Administration of α -Galactosylceramide improves adenine induced renal injury. Cristhiane Favero Aguiar, Cristiane Naffah de Souza, Angela Castoldi, Matheus Correa-Costa, Tarcio Braga, Érika Lamkowski Naka, Mariane Tami Amano, Debora Abate, Meire Hyane, Marcos Antônio Cenedeze, Alvaro Pacheco e Silva Filho, Niels Olsen Saraiva Câmara, *Molecular Medicine*

-MANUSCRITOS SUBMETIDOS

The dual side of macrophages: their role on obesity development Angela Castoldi, Cristiane Naffah de Souza e Niels Olsen Saraiva Câmara, *Frontiers in Immunology*

ANEXO E - Genotipagem

C=controle; M=mutante (700 bp); WT=selvagem (350bp)

M= mutante 353 bp; H= heterozigose 353 bp e 266 bp