



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

JHEFFERSON BARBOSA GUIMARÃES

**Efeitos da suplementação com prebiótico inulina na produção de butirato e
imunorregulação do diabetes tipo 1 em modelo experimental**

Ribeirão Preto

2021

Versão corrigida.

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

JHEFFERSON BARBOSA GUIMARÃES

Efeitos da suplementação com prebiótico inulina na produção de butirato e imunorregulação do diabetes tipo 1 em modelo experimental

Dissertação de mestrado apresentada
à Faculdade de medicina de Ribeirão
Preto – USP para obtenção do título de
mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia
Básica e Aplicada

Orientadora: Dra. Daniela Carlos
Sartori

Ribeirão Preto

2021

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

FICHA CATALOGRAFICA

Guimarães, Jhefferson Barbosa

Efeitos da suplementação com o prebiótico inulina na produção de butirato e imunorregulação do diabetes tipo 1 em modelo experimental. Ribeirão Preto, 2021. 89 p.

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Área de concentração: Imunologia. – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Sartori, Daniela Carlos.

1. Diabetes tipo 1. 2. Imunorregulação. 3. Prebiótico inulina. 4. Células T reguladoras (Treg). 5. Microbiota intestinal

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Guimarães, Jhefferson Barbosa

Título: Efeito da suplementação com o prebiótico inulina na produção de butirato e imunorregulação do diabetes tipo 1 em modelo experimental

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Daniela Carlos Sartori

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dr. Joilson de Oliveira Martins

Instituição: FCF/USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Caroline Marcantonio Ferreira

Instituição: UNIFESP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunorregulação de Doenças Metabólicas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº do processo 2019/13858-0 vinculado ao Projeto Jovem Pesquisador 2 nº do processo 2018/14815-0, Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Demore o tempo que for para decidir o que quer da vida, e depois que decidir não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir”

Friedrich Nietzsche (Assim falou Zarathustra)

**Dedico este trabalho aos meus pais, Moacir e Sueli, e à minha avó Maria Luci. Sem
você nada disso seria possível. Amo vocês!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e amparo nos momentos difíceis. A minha família por toda dedicação e incentivo para que eu pudesse finalizar mais essa etapa de formação acadêmica.

A minha namorada Amanda Karen por sempre me apoiar e me fazer ser melhor a cada dia. Te amo!

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação e me inspiram dentro e fora da vida acadêmica.

À minha orientadora, Professora Dra. Daniela Carlos Sartori, muito obrigado pelos ensinamentos, dedicação e paciência durante esses anos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Vitor, Cleyson, Ítalo, Gabriel, Vanessa, Jefferson Elias, Jefferson Leite e Fernanda, muito obrigado por me ajudarem na vida pessoal e acadêmica. Sem vocês a vida longe de casa e a execução desse projeto seria muito mais difícil.

Aos técnicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em especial: Elaine, Wander, Denise, Wendy, Rubilan e Adriana, vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

A Ana, que sem dúvidas é a melhor secretária que um programa de pós graduação pode ter, efetuando um excelente trabalho na pós graduação, sempre dando suporte e ajudando com eficiência todos os alunos.

Às agências financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPESP. Sem o financiamento de vocês esse trabalho não existiria.

GUIMARÃES, J. B. **Efeitos da suplementação com prebiótico inulina na produção de butirato e imunorregulação do diabetes tipo 1 em modelo experimental.** 2021. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

O Diabetes melitos tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela perda progressiva da autotolerância a antígenos das células β -pancreáticas produtoras de insulina, o que leva à destruição seletiva destas células por linfócitos autorreativos ativados como decorrência da inflamação nas ilhotas pancreáticas (insulite). Diversos estudos têm demonstrado a relação da quebra da tolerância imune intestinal com diversas doenças, como obesidade, alergias, doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide e diabetes tipo 1 e 2. A suplementação com o prebiótico inulina pode modular a microbiota intestinal favorecendo o aumento de bactérias probióticas que ao metabolizar essa fibra produz os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os quais são importantes na imunorregulação e manutenção da homeostasia intestinal. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar se a suplementação com o prebiótico inulina confere proteção ao desenvolvimento do DM1 em camundongos no modelo de múltiplas doses induzidas por estreptozotocina (STZ). Adicionalmente, tivemos como intuito elucidar se o efeito benéfico é mediado pela modulação da microbiota intestinal e produção de AGCC. Foi realizado o monitoramento dos parâmetros clínicos, metabólicos e histopatológicos em camundongos diabéticos suplementados ou não com inulina. Os animais suplementados com inulina tiveram proteção total ao desenvolvimento do DM1, uma vez que 100% dos animais não desenvolveram a doença após administração de STZ (STZ+INU). Após suplementação com inulina, os animais exibiram ganho de peso corporal, melhora do controle glicêmico, reduzido infiltrado inflamatório pancreático e normalização nos níveis de insulina sérica em relação aos animais diabéticos com dieta padrão (STZ+DP). Os animais STZ+INU apresentaram maior produção de muco no cólon associado a prevalência de gêneros *Bifidobacterium*, *Clostridium cluster IV* e *Akkemansia muciniphila* na microbiota intestinal. No linfonodo cecal (LC) dos animais STZ+INU, observamos diminuição de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ expressando CCR4⁺. Em paralelo, comprovamos aumento significativo da expressão genica de marcadores de células dendríticas tolerogênicas como enzima retinaldeído desidrogenase (Aldh1e2) e enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO),

assim como elevada produção de butirato no conteúdo fecal do cólon dos animais suplementados com inulina. No tecido pancreático, verificamos aumento de células Treg Foxp3+CCR4+ e expressão proteica de CCL17. Em conjunto, nossos achados mostraram a eficácia da suplementação da inulina como intervenção nutricional na prevenção do diabetes tipo 1 em modelo experimental, através da migração de células Treg via CCR4 para o pâncreas e elevada produção de butirato pela microbiota intestinal.

Palavras chave: Palavras chave: Diabetes tipo 1, Imunorregulação, Prebiótico inulina, Células T reguladoras (Treg), Microbiota intestinal.

GUIMARÃES, J. B. 2021. **Effects of prebiotic inulin supplementation on butyrate production and immunoregulation of type 1 diabetes in an experimental model.** 2021. Master 's Dissertation – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2021.

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disease characterized by the progressive loss of self-tolerance to insulin-producing pancreatic β -cell antigens, which leads to selective destruction of these cells by activated autoreactive lymphocytes as a result of inflammation in the pancreatic islets (insulinitis). Several studies have demonstrated the relationship between the breakdown of intestinal immune tolerance and various diseases, such as obesity, allergies, inflammatory bowel diseases, rheumatoid arthritis and type 1 and 2 diabetes. Supplementation with the prebiotic inulin can modulate the intestinal microbiota, favoring the increase of bacteria probiotics that, when metabolizing this fiber, produce short-chain fatty acids (SCFA), which are important in immunoregulation and maintenance of intestinal homeostasis. Thus, this study aimed to evaluate whether supplementation with the prebiotic inulin protects the development of DM1 in mice in the multiple dose model induced by streptozotocin (STZ). Additionally, we aimed to elucidate whether the beneficial effect is mediated by the modulation of the intestinal microbiota and SCFA production. Monitoring of clinical, metabolic and histopathological parameters was performed in diabetic mice supplemented or not with inulin. The animals supplemented with inulin had total protection against the development of DM1, since 100% of the animals did not develop the disease after administration of STZ (STZ+INU). After inulin supplementation, the animals exhibited body weight gain, improved glycemic control, reduced pancreatic inflammatory infiltrate and normalization of serum insulin levels compared to diabetic animals on standard diet (STZ+DP). The STZ+INU animals showed greater mucus production in the colon associated with the prevalence of genera *Bifidobacterium*, *Clostridium cluster IV* and *Akkemansia muciniphila* in the intestinal microbiota. In the cecal lymph node (LC) of STZ+INU animals, we observed a decrease in CD4+Foxp3+ Treg cells expressing CCR4+. In parallel, we demonstrated a significant increase in the gene expression of tolerogenic dendritic cell markers such as retinaldehyde dehydrogenase (Aldh1e2) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme, as well as increased production of butyrate in the fecal content of the colon of

animals supplemented with inulin. In pancreatic tissue, we verified an increase in Treg Foxp3+CCR4+ cells and protein expression of CCL17. Together, our findings showed the efficacy of inulin supplementation as a nutritional intervention in the prevention of type 1 diabetes in an experimental model, through the migration of Treg cells via CCR4 to the pancreas and high production of butyrate by the intestinal microbiota.

Keywords: Type 1 diabetes, Immunoregulation, Prebiotic Inulin, Regulatory T cells (Treg), Intestinal microbiota.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Diabetes melito tipo 1: aspectos gerais	17
1.2 Modelos experimentais para DM1: camundongos NOD e induzidos por STZ	19
1.3 Linfócitos T reguladores e linfócitos T efetores: geração, caracterização e função no DM1	21
1.4 Mucosa intestinal e a microbiota: características estruturais, fisiológicas e evidências na DM1	24
1.5 Papel da dieta e das fibras alimentares na microbiota intestinal.....	26
1.6 Prebiótico Inulina e seus efeitos no colón intestinal.....	27
1.7 Ácidos Graxos de cadeia curta e suas funções na mucosa intestinal.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Animais.....	29
2.2 Valores nutricional das dietas Inulina e Padrão	29
2.3 Indução da DM1 e monitoramento da glicemia.....	30
2.4 Imunohistoquímica	30
2.5 Análise histopatológica.....	30
2.6 Marcação para muco com ácido periódico de Schiff (PAS).....	30
2.7 Avaliação de leucócitos por citometria de fluxo (FACS).....	31
2.8 Extração do RNA e construção do cDNA	31
2.9 Reação de PCR em tempo real	31
2.10 Quantificação de citocinas por ELISA	32
2.11 Quantificação de insulina por ELISA	32
2.12 Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta por cromatografia gasosa	32
2.13 Quantificação de bactérias intestinais por qPCR.....	33
2.14 Imunofluorescência no tecido pancreático.....	33
2.15 Análise estatística	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. RESULTADOS.....	36

4.1	A suplementação com inulina conferiu efeito preventivo contra o desenvolvimento do DM1 em camundongos após administração com STZ.....	36
4.2	A suplementação com inulina ocasionou aumento da população de linfócitos Treg CCR4+ nos linfonodos pancreáticos (LP) e no pâncreas de animais após administração com STZ.....	38
4.3	A suplementação com inulina inibiu o infiltrado inflamatório e aumentou a produção de muco no cólon de camundongos após administração com STZ.....	43
4.4	A suplementação com inulina causou prevalência dos filos Firmicutes e Verrucomicrobia na microbiota intestinal após administração com STZ.....	46
4.5	A suplementação com inulina potencializou a expressão gênica de receptores de AGCC e marcadores de células Treg e DCs tolerogênicas no linfonodo cecal (LC)	49
4.6	A suplementação com inulina reduziu a população de células Treg no LC de camundongos após administração com STZ.....	51
4.7	A suplementação com inulina causou reduzida geração de células Foxp3+CCR4+ no linfonodo cecal de camundongos após administração com STZ...	52
4.8	Suplementação com inulina ocasionou aumento da produção de butirato no conteúdo fecal de camundongos após administração com STZ.....	53
4.9	A suplementação com butirato conferiu proteção contra o desenvolvimento do DM1 em camundongos após STZ.....	54
4.10	A suplementação com butirato diminuiu o número de células Treg CD4+Foxp3 com aumento de células expressando CCR4 nos LP de camundongos após STZ.....	56
4.11	A suplementação com butirato reduziu o número de células CD4+ e CD8+ patogênicas nos LP de camundongos após STZ.....	58
4.12	A suplementação com butirato tende a aumentar o número de células Foxp3+CCR4 no LC de camundongos após STZ.....	60
4.13	A suplementação com butirato aumentou o número de células dendríticas tolerogênicas nos camundongos após STZ.....	62
5.	DISCUSSÃO.....	64
6.	CONCLUSÃO.....	70
	REFERENCIAS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parâmetros clínicos, metabólicos e histopatológicos do DM1 após suplementação com prebiótico inulina .	37
Figura 2. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg CD4+Foxp3+ nos LP após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	39
Figura 3. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg Foxp3+CCR4+ nos LP após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	40
Figura 4. Dosagem de quimiocinas e citocinas no tecido pancreático e análise de células Foxp3+CCR4+ nas ilhotas pancreáticas após a suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	42
Figura 5. Histologia e produção de muco no cólon intestinal após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	44
Figura 6. Expressão gênica de mucinas, ZO-1, CCL17 e IL-22 no colón intestinal após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	45
Figura 7. Perfil da microbiota intestinal à nível de filos após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	47
Figura 8. Análise da microbiota fecal após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	48
Figura 9. Análise da expressão de receptores de AGCC, marcadores de Treg e DCs após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	50
Figura 10. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg CD4+Foxp3+ nos LC após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	51
Figura 11. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg Foxp3+ CCR4+nos LC após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH.	52

Figura 12. Produção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH	53
Figura 13. Parâmetros clínicos, metabólicos e histopatológicos do DM1 após suplementação com butirato.....	55
Figura 14. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg CD4+Foxp3+ e Foxp3+ CCR4+ nos LP após suplementação com butirato em animais administrados com STZ	57
Figura 15. Porcentagem e número absoluto de linfócitos CD4+CD69+ e CD8+ CD69+ nos LP após suplementação com butirato em animais administrados com STZ.....	58
Figura 16. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg CD4+Foxp3+ e Foxp3+ CCR4+ no LC após suplementação com butirato em animais administrados com STZ	61
Figura 17. Porcentagem e número absoluto de células dendríticas tolerogênicas CD103+CD11b+ e CD103+CD11b- no LC de camundongos após suplementação com butirato em animais administrados com STZ.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes melito tipo 1: aspectos gerais

O Diabetes melito tipo 1 (DM1) é caracterizado como uma doença autoimune que ocorre perda progressiva da autotolerância aos antígenos das células β -pancreáticas, o que leva à destruição seletiva destas células principalmente por linfócitos autorreativos ativados gerando inflamação nas ilhotas pancreáticas, processo conhecido como (insulite) (TSAI; SHAMELI; SANTAMARIA, 2008). Como consequência, ocorre a perda total ou parcial da produção de insulina e aumento nos níveis séricos de glicose, o que pode levar a uma série de complicações, como cetoacidose, falência renal, problemas cardiovasculares, cegueira (ATKINSON; EISENBARTH, 2001), maior permeabilidade intestinal (THAISS, 2018) dentre outros.

O DM1 é uma das doenças crônicas mais comuns na infância e também tem sido diagnosticada cada vez mais em adultos (CARDWELL *et al.*, 2005). A incidência varia significativamente de acordo com a distribuição geográfica, sendo que, de forma geral, quanto maior a latitude da região (distância do equador), maior risco associado à doença. Com isso, quando um grupo de pessoas se muda de uma região de baixa incidência para uma área com alta incidência, o risco de desenvolver o DM1 também aumenta. No entanto, também são observadas variações em áreas de mesma latitude, sugerindo a influência de múltiplos fatores ambientais no desenvolvimento da doença (ROSENBAUER *et al.*, 1999). Os países mais afetados são: Finlândia e Suécia com taxas anuais de 30 e 57 indivíduos afetados pela DM1 a cada 100 mil habitantes, já os países com menor incidência da doença estão localizados na América do Sul, como por exemplo, a Venezuela com taxas de 0,1/100.000 habitantes (KARVONEN, 2006; PATTERSON, C. *et al.*, 2014).

Apesar da exata etiologia da doença permanecer desconhecida, já está claro que o seu desenvolvimento se dá em indivíduos suscetíveis geneticamente, afetados por determinados fatores ambientais, os quais funcionam como gatilhos. Isso pode ser evidenciado em estudos com gêmeos monozigóticos, nos quais a concordância da doença é observada nos dois em cerca de 50% dos casos, enquanto nos outros 50% um dos dois manifesta a doença, enquanto o outro não (KYVIK; GREEN; BECK-

NIELSEN, 1995) Outra evidência da influência de fatores ambientais na doença é o fato da incidência do DM1 ter aumentado consideravelmente nos últimos 30 anos (PATTERSON, C. C. *et al.*, 2009). Isso sugere que os fatores ambientais que desencadeiam o início da patologia estão afetando cada vez mais os indivíduos geneticamente suscetíveis (GREEN; PATTERSON, 2001) tendo em vista que este rápido crescimento não pode ser explicado somente pela transmissão de haplótipos de suscetibilidade de uma geração para outra (GILLESPIE *et al.*, 2004). Portanto, pode-se dizer que os genes envolvidos não operam sozinhos, mas são influenciados pela ação dos outros fatores, de forma que o grau de risco de um fator é influenciado pela presença ou falta de outro (ANAYA *et al.*, 2016).

Atualmente mais de 50 *loci* de suscetibilidade à DM1 foram identificados. No entanto, os que apresentam maior *odds ratio* (razão de possibilidade) são os genes do HLA de classe II (*Human leukocyte antigen*) para haplótipos específicos (ERLICH *et al.*, 2008), seguidos de polimorfismos na região promotora do gene da insulina. Além desses, apenas outros dois genes, *PTPN22* (fosfatase linfóide) e *IL2RA* (cadeia alfa do receptor de IL-2) têm reportado uma *odds ratio* consistente e relevante nos diversos estudos publicados nos últimos anos (POCIOT *et al.* 2010). Porém, para alguns pesquisadores, o gene da molécula CTLA-4 também é fortemente considerado (VAN BELLE, Tom L.; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011a).

Dentre os fatores ambientais, alguns que explicariam o aumento na incidência da DM1 são, por exemplo, determinadas infecções virais (geralmente por enterovírus) (COPPIETERS *et al.*, 2012; HOBBER; SAUTER, 2010), deficiência de vitamina D (TAKIISHI *et al.*, 2010) consumo de uma dieta típica da sociedade ocidental (rica em açúcar e gordura, pobre em fibras) (MENZEL *et al.*, 2015) dieta contendo glúten (BARERA *et al.*, 2002; WESTERHOLM-ORMIO *et al.*, 2003), desequilíbrio da microbiota intestinal (VAARALA, 2012a), entre outros. Interessantemente, esses fatores de risco surgiram como consequência das mudanças dos hábitos que ocorreram com a industrialização (ROOK; RAISON; LOWRY, 2012). Isso pode ser verificado através da hipótese da higiene (STRACHAN, 1989) e estudos mais recentes que adicionam outros fatores a essa hipótese, como a microbiota intestinal e a vitamina D. É importante ressaltar isso, pois essas hipóteses parecem contribuir para elucidação da crescente incidência da DM1 e de outras doenças autoimunes nos últimos anos

(BARBEAU; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2007; CLARK; MACH, 2016)

Sabe-se que a DM1 possui uma fase assintomática, que pode durar de meses a anos, seguida da fase sintomática (INSEL *et al.*, 2015). Vários modelos foram propostos para o desenvolvimento da doença a fim de tentar integrar os riscos genéticos e ambientais que culminam nas características imunológicas das fases pré-clínica e clínica verificadas nos indivíduos (EISENBARTH, 1986). Um dos modelos mais aceitos sugerem que um desequilíbrio entre a ação das células T efectoras (Teff) autorreativas e células T reguladoras (Tregs) ocorreria a partir da coocorrência de fatores genéticos e ambientais, o que eventualmente levaria a um declínio da massa das células β -pancreáticas. Deste modo, ocorre o processo de autoimunidade nas ilhotas pancreáticas, porém esse efeito pode ser balanceado pela resposta proliferativa das células β , o que leva a uma normalização temporária da glicemia (fase denominada como “lua de mel”) (BONIFACIO *et al.*, 1999; VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

1.2 Modelos experimentais para DM1: camundongos NOD e induzidos por STZ

O entendimento da genética, etiologia e patogênese do DM1 foi possível pela criação de modelos experimentais no início dos anos 80, principalmente através do *non-obese diabetic mouse* (NOD). Este modelo surgiu através de cruzamentos repetitivos entre irmãos com a intenção de gerar camundongos propensos a desenvolver catarata. Porém, no meio do processo observaram que uma linhagem desenvolveu diabetes de maneira espontaneamente (MAKINO *et al.*, 1980). E depois disso, foi observado que a diabetes desenvolvida neste modelo possuía grandes semelhanças com o DM1 em humanos (KIKUTANI; MAKINO, 1992; SHODA *et al.*, 2005)

Uma dessas semelhanças é o fato destes camundongos possuírem um determinado haplótipo de HLA, que é o principal fator genético que contribui para a suscetibilidade da doença (WICKER; TODD; PETERSON, 1995). Curiosamente, uma das características deste haplótipo é haver um ácido não aspártico na posição 57 da cadeia beta da molécula I-A (KANAGAWA *et al.*, 1998). Essa substituição também é vista na cadeia beta do haplótipo DQ humano, presente num loci de suscetibilidade ao DM1 (TODD, 1990). Outra característica do NOD é que a incidência da doença depende fortemente do local onde os camundongos estão sendo mantidos, sendo maior

em locais relativamente livres de colonização por microrganismos, mas drasticamente menor em locais convencionais (SINGH; RABINOVITCH, 1993).

Em relação às características imunológicas, foi observado que o desenvolvimento do diabetes nestes animais começa aproximadamente com 5 semanas de vida, com uma insulite inicial, caracterizada por um agregado leucocitário na periferia das ilhotas pancreáticas e também um infiltrado linfocítico. Essas populações consistem em linfócitos TCD4+, seguido de linfócitos TCD8+, de macrófagos e linfócitos B em menores números (ZHANG, S. *et al.*, 2010). Em especial, foi demonstrado que essas células T são predominantemente autorreativas a insulina (WEGMANN; EISENBARTH, 2000), mas também são autorreativas a outros antígenos, como o GAD65 (glutamato descarboxilase) (VON BOEHMER; SARUKHAN, 1999). Adicionalmente, foi observada a presença dessas células T autorreativas no baço, nas ilhotas pancreáticas e no linfonodo pancreático dos animais. Camundongos transgênicos SCID (*severe combined immunodeficiency*) ou RAG KO (*knockout*) (ausência de linfócitos) expressando os TCRs de linfócitos diabetogênicos do NOD desenvolveram diabetes. Também foi mostrado que há uma progressiva diminuição na proporção de Treg/Teff nas ilhotas pancreáticas, mas não nos linfonodos pancreáticos (TANG *et al.*, 2008). Portanto, apesar das limitações, o NOD é um dos melhores modelos para estudar o DM1.

Enquanto o NOD consiste em um modelo espontâneo, e possível induzir camundongos a desenvolverem o DM1 a partir da administração i.p de estreptozotocina (STZ). A STZ é um análogo a N-acetilglucosamina isolada do *Streptomyces achromogene*, sendo este composto muito similar à glicose e possui baixa afinidade ao GLUT2 (transportador de glicose 2). Por conta disso, ele chega ao interior das células β -pancreáticas e exerce efeitos citotóxicos. Essas células apresentam alta expressão do GLUT2, mas células renais, hepáticas e epiteliais intestinais também expressam em menores quantidades. Assim sendo, também ocorre certa toxicidade nesses tecidos (DUFRANE *et al.*, 2006). A dose e a frequência neste modelo experimental são extremamente importantes, uma vez que altas doses induzem diabetes fulminante (WOOD; RAO; FREY, 1999). No regime de múltiplas doses com baixas concentrações, a toxicidade aguda nas células β não é observada, mas a tolerância para antígenos das ilhotas é abolida, tendo como resultado tanto o desenvolvimento de uma resposta

humoral com a produção de anticorpos (HEROLD *et al.*, 1995) quanto uma resposta celular mediada por linfócitos T autorreativos específicos para antígenos das células β (HORWITZ *et al.*, 2002). Portanto, esse modelo possibilita o estudo sincronizado de grupos experimentais e em menor tempo do que nos camundongos NOD, sendo mais viável testar uma hipótese primeiramente no modelo induzido por STZ e posteriormente validar no NOD (VAN BELLE, T. L.; TAYLOR; VON HERRATH, 2009)

1.3 Linfócitos T reguladores e linfócitos T efetores: geração, caracterização e função no DM1

Como citado anteriormente, o DM1 se desenvolve principalmente a partir do desequilíbrio das respostas de linfócitos T reguladores e linfócitos T efetores autorreativo (VAN BELLE, Tom L.; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). Tendo isso em vista, é importante entender algumas das possíveis origens e funções desses linfócitos e como o desequilíbrio entre essas populações celulares culmina na autoimunidade.

Há quatro categorias de tolerância imune que poderiam proteger as células β da destruição por linfócitos autorreativos: seleção negativa durante o desenvolvimento tímico, ignorância imunológica, anergia e supressão por linfócitos T reguladores CD25⁺ (IL2RA) tímicos (naturais) e periféricos (induzidos) expressando o fator de transcrição Foxp3. Como o desenvolvimento do DM1 é lento e desencadeado por fatores ambientais, parece razoável investigar a influência das Tregs nessa patologia, já que a geração dessas células depende fortemente do microambiente na qual elas se encontram e este microambiente também é intensamente influenciado por fatores ambientais (BURRACK; MARTINOV; FIFE, 2017), além do já conhecido envolvimento de ambas populações dessas células na prevenção de diversas disfunções, como outras doenças autoimunes, alergias, lesões relacionadas a infecções e rejeição a transplantes, sendo tudo isso possível através da supressão de linfócitos T efetores e de outras células adaptativas e inatas (SAKAGUCHI, 2004). Isso demonstra a relevância das Tregs no controle da resposta imune a antígenos próprios e não próprios (SGOUROUDIS; PICCIRILLO, 2009).

As Tregs naturais surgem no timo através do reconhecimento de autoantígenos e constituem cerca de 2-10% das células TCD4⁺ totais, enquanto as periféricas adquirem o

perfil característico de Treg fora do timo ao serem expostas a determinados mediadores solúveis, como IL-2, IL-10 e TGF- β , ou através da interação com APCs em determinados microambientes (BENOIST; MATHIS, 2012). As Tregs podem exercer seus mecanismos inibitórios de diversas formas e isso é condicionado por determinados elementos, como especificidade, localização e ações efetoras, os quais refletem as características intrínsecas dessas células. Por exemplo, a especificidade do TCR destas células é essencial para inibir células que apresentam antígenos cognatos, promovendo morte direta de linfócitos B e células dendríticas nestas situações. Também é essencial para supressão *bystander* de células vizinhas reconhecendo o mesmo antígeno (SUFFIA *et al.*, 2006).

Em relação à localização, as Tregs podem influenciar o desenvolvimento das Teffs em diversos pontos de ativação: ativação inicial nos linfonodos, durante a migração para os órgãos-alvo ou no sítio de inflamação. A especificidade do TCR pode contribuir para a migração aos locais de inflamação, mas isso é influenciado principalmente pela expressão de determinados receptores de quimiocinas (WEI *et al.*, 2006). Por exemplo, o CXCR5 é expresso por Tregs que controlam os centros germinativos, enquanto o CCR9+ e o CX3CR1 são necessários para as Tregs se expandirem na lâmina própria intestinal (HADIS *et al.*, 2011; LINTERMAN *et al.*, 2011). Também expressão o receptor de CCR4+ respondendo as quimiocinas CCL17 e CCL22 preferencialmente, desempenhando papel importante no tráfego dessas células para os linfonodos drenantes, sendo crítico para a função supressora *in vivo* (YUAN *et al.*, 2007).

As estratégias efetoras dessas células resumem-se a liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGFB, IL-35), privação de IL-2 (importante fator de crescimento), morte direta através de granzimas, supressão da maturação de DCs, ausência de ligação a moléculas coestimulatórias de APCs, entre outras. Essa ampla diversidade de mecanismos efetores reflete a variedade de células alvos e traz também a possibilidade de que o defeito das Tregs em determinadas doenças autoimunes seja devido apenas a algum desses mecanismos em vez de uma diminuição geral no seu número ou atividade geral (SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012). Por exemplo, inibição da diferenciação e maturação das DCs é particularmente importante no contexto da autoimunidade e na tolerância a antígenos próprios. De acordo com ARANOW (2011),

de fato a apresentação de antígenos por DCs maduras facilita uma resposta imune contra o antígeno, enquanto a apresentação de um antígeno por DCs imaturas facilita a tolerância. Antígenos próprios são abundantes em um estado normal de morte fisiológica das células, no entanto, a apresentação desses antígenos frequentemente é feita por DCs imaturas, de forma que a tolerância aos antígenos próprios seja mantida.

É importante ressaltar que essas células normalmente expressam o Foxp3 de forma estável durante toda a vida de um camundongo, porém essa estabilidade pode ser alterada dependendo do microambiente que a célula se encontra, levando a uma menor expressão deste fator e podendo perder sua capacidade supressora, como na ausência de IL-2, por exemplo (RUBTSOV *et al.*, 2010). Apesar disso, também há relatos de células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ com atividade supressora (BONELLI *et al.*, 2009). Além disso, tem sido mostrado que algumas Tregs podem expressar o Foxp3 de forma transitória (POLANSKY *et al.*, 2010). Adicionalmente, essas ocorrências podem levar à geração de células Foxp3 produtoras de IL-17, que não possuem atividade supressora, mas sim, inflamatória (ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009; ZIEGLER, 2007). Tendo isso em vista, a melhor maneira de discriminar células T reguladoras eficientemente supressivas é através da desmetilação de determinadas regiões do *locus* do Foxp3 (TSDR: *Treg-specific demethylated region*) (FLOESS *et al.*, 2007).

Em relação às células T efetoras participantes na DM1, elas podem ser divididas em quatro grupos principais: TCD8⁺, Th1, Th17 e Tfh (*follicular T-helper*) (ARIF *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; PUGLIESE, 2017). Esses linfócitos possuem TCRs que podem reconhecer múltiplos antígenos, podendo ser específicos para diversos peptídeos derivados das ilhotas pancreáticas, o que leva um perfil único em cada indivíduo com DM1. Essa diversidade de respostas efectoras juntamente à expansão oligoclonal de linfócitos contendo determinados TCRs levou ao conceito de “foco determinante”, no qual uma resposta inicial fortemente diversa de células T é progressivamente restringida pela expansão seletiva de determinados linfócitos efetores dominantes durante o desenvolvimento da doença (NEPOM, 2003). A maneira que cada Treg se expande provavelmente depende fortemente de aspectos altamente variáveis dentre os indivíduos, como a densidade do antígeno, o processamento do antígeno, outras moléculas de HLA, entre outros. Alguns estudos também relataram Tregs que reconheciam autoantígenos das ilhotas modificados por mudanças pós traducionais, o

que sugere que uma mudança no repertório de antígenos acontece ao longo do tempo, podendo contribuir para a variabilidade de determinados padrões imunodominantes (MANNERING *et al.*, 2005; VAN LUMMEL *et al.*, 2014).

Os linfócitos T efetores se desenvolvem nos órgãos linfóides secundários após interagirem com alguma célula apresentadora de antígenos. Dependendo do estímulo originado dessa interação e das citocinas contidas no microambiente, o linfócito passa a expressar fatores de transcrição específicos de cada perfil efector juntamente à produção de determinadas citocinas, sendo caracterizados da seguinte forma: Th1 expressa o fator de transcrição T-bet e produz IL-2 e IFN- γ (PECK; MELLINS, 2010); Th17 expressa ROR γ T e RORc e produz IL-17A e IL-17F (FIGUEIREDO; SCHUMACHER, 2016; IVANOV *et al.*, 2006) Tfh expressa CXCR5 e BCL6 e produz IL-21, estando fortemente relacionado com a produção de anticorpos de alta afinidade e troca de isotipos (CROTTY, 2011; KIM, C. H. *et al.*, 2001) por fim linfócitos TCD8+ caracterizam-se diferentemente das outras células efectoras, interagir com MHC-I, além de expressar eomesodermina (T-box 2) e T-bet, e produzir INF- γ (COX; HARRINGTON; ZAJAC, 2011).

Na DM1, ainda há uma investigação inacabada sobre a origem do efeito de desequilíbrio de respostas T reguladoras e autorreativas. Antigamente os pesquisadores acreditavam que isso acontecia devido a uma diminuição no número de células T reguladoras nos indivíduos doentes (KUKREJA *et al.*, 2002), porém posteriormente outros estudos demonstraram níveis normais de células expressando Foxp3 (BRUSKO *et al.*, 2007; PUTNAM *et al.*, 2009). Contudo, esses estudos não consideraram a heterogeneidade de células expressando Foxp3, nem todas sendo efetivamente supressoras.

1.4 Mucosa intestinal e a microbiota: características estruturais, fisiológicas e evidências na DM1

A mucosa intestinal possui quatro tipos de barreiras que apresentam a função de defender o corpo humano de patógenos do meio ambiente. Essas barreiras são: barreira mecânica, química, imune e biológica. A barreira mecânica é constituída principalmente por células epiteliais intestinais e junções do tipo tight. A junção *tight* (TJ) constitui a principal ligação entre as células epiteliais da mucosa intestinal. Também desempenham

um papel importante na manutenção da integridade da estrutura e função normal da barreira mucosa intestinal. Já a barreira química é composta pelos ácidos digestivos secretados, enzimas digestivas, lisozima, mucopolissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídios. Com isso, essas substâncias estão envolvidas no processo de bacteriólise que possui a finalidade de conter bactérias patogênicas. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e a imunoglobulina A secretora (SIgA), bem como algumas células especiais (como macrófagos, células natural killer e linfócitos intraepiteliais) constituem a barreira imunológica, que é uma garantia importante para a homeostase da imunidade intestinal afim de identificar os autoantígenos e antígenos exógenos para regular a resposta imune. Por fim, a barreira biológica é um microecossistema interdependente e inter-relacionado composto principalmente da microbiota intestinal residente, entre os quais os anaeróbios obrigatórios são a comunidade bacteriana dominante. A barreira mucosa intestinal é uma barreira constituída entre o organismo e o meio ambiente. Essas quatro barreiras têm estruturas distintas e mecanismos reguladores, onde cada um desempenha um papel diferente na função biológica. A barreira mucosa intestinal pode efetivamente manter o equilíbrio entre os fatores pró e anti-inflamatórios além de impedir que microorganismos patogênicos entrem nos tecidos, conseguindo manter o corpo saudável (ANTONI *et al.*, 2014; ARRIETA; BISTRITZ; MEDDINGS, 2006; FARHADI *et al.*, 2003; LUISSINT; PARKOS; NUSRAT, 2016).

A associação entre desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose) e ruptura da barreira intestinal é considerado um dos fatores responsáveis para o desenvolvimento de diversas doenças autoimunes como o DM1 (SHIVAJI, 2017). Estudos com camundongos NOD do tipo *germ free* introduziram o conceito de que a microbiota intestinal interfere no desenvolvimento do DM1, já que estes apresentam maior predisposição à doença (MORDES *et al.*, 2004). Sendo assim, é concebível que a infecção com micobactérias ou estímulo com antígenos bacterianos atrase o estabelecimento de DM1 em camundongos NOD (QIN; SINGH, 1997; SAĚ; RIVEREAU, 1996). Entretanto, outro estudo comprovou que a incidência do DM1 em camundongos NOD fêmeas não necessariamente é afetada por condições “*germ-free*”. Ao contrário, este estudo mostrou que a inoculação de uma bactéria Gram positivas aeróbica (*Bacillus cereus*) promove resistência ao DM1 ao invés de um microambiente bacteriano em especial (KING; SARVETNICK, 2011). Também foi demonstrado que

este efeito protetor é conferido pela alta produção de TGF- β (ALYANAKIAN *et al.*, 2006) . A capacidade do TGF- β em induzir a diferenciação de linfócitos Treg é uma explicação plausível para seu efeito imunomodulador no DM1, uma vez que essas células estão envolvidas na tolerância periférica aos auto-antígenos pancreático.

1.5 Papel da dieta e das fibras alimentares na microbiota intestinal

A capacidade da dieta em modificar a microbiota intestinal de humanos e outros mamíferos foi amplamente estudada, sendo que os estudos indicam que a composição da dieta, a ingestão alimentar habitual e as mudanças dietéticas agudas impactam as comunidades microbianas no intestino (MUEGGE *et al.*, 2011). De modo especial em humanos, os padrões alimentares habituais estão associados a alterações na composição da microbiota intestinal do indivíduo, podendo sofrer rápidas mudanças de acordo com o consumo de macronutrientes e fibras alimentares (WU *et al.*, 2011). Notavelmente, mudanças na diversidade bacteriana e na produção de produtos finais fermentados, tais como acetato e butirato foram detectados nas fezes em apenas 24 horas em humanos que consumiram uma dieta rica em fibras (> 30 gramas/dia) quando comparado à dieta a base de carne que era essencialmente desprovida de fibras (DAVID *et al.*, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003) junto à Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), após o reconhecimento da ingestão inadequada de fibras alimentares, recomendaram o consumo diário ≥ 25 gramas/dia a fim de prevenir doenças não transmissíveis. No Brasil, alguns autores avaliaram que a disponibilidade de fibras alimentares na dieta das famílias é insuficiente (entre 9,9 e 21,4 gramas/dia) e que famílias de menor renda e que residem em áreas rurais apresentavam maior disponibilidade de fibras na dieta em comparação àquelas com maior renda e urbanas (SARDINHA *et al.*, 2014). Adicionalmente, SANTOS *et al.*, (2016) observaram uma baixa quantidade de indivíduos com consumo adequado de fibras alimentares (2,0%) e ingestão média diária de 13,1 gramas.

Estudos pré-clínicos em modelos experimentais demonstram que o consumo de fibras solúveis e fermentáveis aumenta a diversidade microbiana em relação aos camundongos alimentados com dietas desprovidas dessas fibras, e isso se reproduz ao longo das próximas gerações (SONNENBURG *et al.*, 2016). Também foi demonstrado em humanos que a ingestão de fibras alimentares e grãos inteiros foi capaz de aumentar

a diversidade bacteriana da microbiota intestinal (TAP *et al.*, 2015). É importante mencionar que a baixa quantidade de fibras alimentares na dieta ocidental é considerada um fator que causa a diminuição da diversidade microbiana intestinal humana e está correlacionado com o aumento de doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer de cólon (HILLS *et al.*, 2019).

1.6 Prebiótico Inulina e seus efeitos no colón intestinal

Prebióticos são definidos como componentes alimentares seletivamente fermentados que alteram a configuração e/ou a atividade da microbiota gastrointestinal conferindo efeitos benéficos no intestino e servindo como fonte de alimento para os probióticos (GIBSON *et al.*, 2004). Nesse contexto, a inulina é um polissacarídeo da frutose com uma unidade de glicose terminal de origem vegetal solúvel em água pertencente ao grupo de carboidratos não digeríveis chamados frutanos (WICHENCHOT *et al.*, 2011). Alguns alimentos são fontes naturais de inulina, como por exemplo: alcachofra, chicória, aspargos, cebola, banana, alho e trigo (ROBERFROID, 2007). Já na indústria, a inulina é mais comumente extraída da chicória sendo amplamente utilizada na indústria de alimentos processados podendo substituir gorduras e açúcares, conferindo características desejáveis aos alimentos (VAN BEKKUM; RÖPER; VORAGEN, 2007).

O uso do prebiótico inulina é importante para manter a saúde do colón intestinal, melhorando funções fisiológicas e imunológicas contribuindo na melhora de infecções agudas, diarreia, constipação intestinal e em doenças inflamatórias intestinais (SALMINEN *et al.*, 1998). Diante disso, seus efeitos nas doenças inflamatórias intestinais em modelos animais vem sendo amplamente investigado. A colite é uma das doenças inflamatórias intestinais mais estudadas, sendo que em modelos induzidos por dextrano sulfato de sódio (DSS) ou ratos transgênicos que desenvolvem a doença de maneira espontânea (HLA-B27), a administração oral de inulina ocasionou alteração do perfil inflamatório, reduzindo IL-1 β , aumentando TGF- β e favorecendo o aumento de bactérias benéficas no intestino, como as dos gêneros Lactobacilos e Bifidobactérias (HOENTJEN *et al.*, 2005; VIDELA *et al.*, 2001).

1.7 Ácidos Graxos de cadeia curta e suas funções na mucosa intestinal

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são produzidos pela fermentação bacteriana de fibras alimentares não digeríveis nos intestinos, sendo os principais AGCC: acetato, propionato e butirato (KOH *et al.*, 2016a). Foi demonstrada que uma dieta rica em fibras alimentares é capaz de gerar entre 400-800 mmol de AGCC por dia, o que equivale a 10 g de fibra alimentar (CANFORA; JOCKEN; BLAAK, 2015). Após a produção, os AGCC, são absorvidos pelas células epiteliais do intestino entrando na corrente sanguínea por meio das veias mesentéricas superior e inferior. Logo, entram na corrente sanguínea, afetando o metabolismo e a função dos tecidos periféricos como tecido adiposo, músculo esquelético e fígado (BLOEMEN *et al.*, 2009).

A capacidade dos AGCC em modular funções de diferentes tecidos é um fator chave para regular distúrbios metabólicos e imunológicos, principalmente por meio da inibição de histonas desacetilases e da ativação de receptores acoplados a proteína G, como GPR41, GPR43 E GPR109a (PARADA VENEGAS *et al.*, 2019). Com isso, os AGCC influenciam nas respostas autoimunes sistêmicas agindo em diferentes etapas do processo de inflamação regulando a função efetora de vários tipos de células imunes, alterando a expressão gênica, diferenciação, quimiotaxia, proliferação e apoptose (HAGHIKIA *et al.*, 2015; THORBURN; MACIA; MACKAY, 2014). Baseado nessas evidências, o uso da suplementação com o prebiótico inulina como estratégia de modulação da microbiota intestinal em animais diabéticos e consequente produção de AGCC, pode ser um fator chave no controle do desenvolvimento da doença, melhorando seus aspectos clínicos, metabólicos e imunológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP machos selvagens (*wild type* – WT), entre 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 20 e 25 gramas, divididos da seguinte forma: grupo 1 animais WT controles, que receberam a ração padrão e a administração do veículo citrato de sódio (WT+VH+DP); grupo 2 animais WT, que receberam a dieta padrão e a administração da STZ (WT+STZ+DP); grupo 3 animais WT controles, que receberam a dieta com 10% de inulina e administração do veículo citrato de sódio (WT+VH+INU) e o grupo 4 animais WT, que receberam a dieta com 10% de inulina e a administração da STZ (WT+STZ+INU). Os animais foram suplementados com a dieta padrão ou contendo 10% de inulina uma semana antes e 2 semanas depois da primeira administração do VH ou STZ. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios propostos pelas normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, Protocolo nº 146/2020.

2.2 Composição nutricional das dietas Inulina e Padrão

A composição das diferentes dietas utilizados neste estudo estão listados na tabela 1. Os valores de cada item correspondem a quantidade em gramas para a produção de um total de 1 kg de ração.

Tabela 1. Tabela nutricional das dietas Inulina e Controle (Padrão)		
	Controle	inulina 10%
Amido	465,7	465,7
Caseína	140	140
Amido dextrinizado	155	48,39
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Inulina	0	106,61
Celulose microcristalina	50	50
Mix Mineral (AIN-93M)	35	35
Mix vitamínico (AIN-93M)	10	10
L-cistina	1,8	1,8
Bitartarato de colina (41% de colina)	2,5	2,5

2.3 Indução da DM1 e monitoramento da glicemia

Os animais receberam cinco injeções i.p. diárias de STZ na concentração final de 40 mg/kg de peso do animal em solução de citrato de sódio 0.1 M, pH=4,5. A glicemia foi avaliada nos dias 0, 5, 10 e 15 dias após o esquema de administração da STZ ou VH. Para tal, uma gota de sangue foi retirada da base da cauda de cada animal e a taxa de glicose foi quantificada no aparelho Prestige LX (Prestige Smart System) após os animais permanecerem 6 horas em Jejum, sendo considerado diabéticos, os animais que apresentarem pelo menos duas glicemias consecutivas acima de 200mg/dL.

2.4 Imunohistoquímica

Os cortes histológicos de 4 µm foram incubados com tampão citrato/ácido cítrico (pH=6) 2 vezes durante 5 minutos no microondas para exposição dos antígenos de superfície celular. As amostras foram incubadas com anticorpo primário para as moléculas de interesse. Após o período de incubação as amostras foram lavadas com PBS/Tween e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com biotina (Vector, VA, USA). Por fim, foi realizado o tratamento com o substrato DAB (Research Genetics) e contra-coloração com hematoxilina.

2.5 Análise histopatológica

A avaliação histopatológica do infiltrado inflamatório no pâncreas foi realizada após coloração com hematoxilina e eosina (HE) de amostras fixadas em PBS/formaldeído 10%. Foram analisadas em média de 120 ilhotas por grupo, que receberam um escore baseado no nível do infiltrado inflamatório, sendo classificadas em: sem insulite, peri-insulite, moderada ou insulite invasiva.

2.6 Marcação para muco com ácido periódico de Schiff (PAS)

Os cortes histológicos do colón intestinal foram desparafinizados com Xilol e cobertos com Ácido periódico a 0,5% por 15 minutos. Após isso, foram lavados com água destilado por 5 minutos e cobertos com o reativo de Schiff por 30 minutos.

2.7 Avaliação de leucócitos por citometria de fluxo (FACS).

A análise quantitativa e fenotípica de células extraídas dos linfonodos pancreáticos e cecal foi realizada por citometria de fluxo. Após digestão enzimática das amostras, foram identificados e quantificados leucócitos presentes nestes linfonodos dos camundongos. Para caracterização fenotípica das células T reguladoras e linfócitos TCD4 e TCD8, foi avaliada a expressão dos seguintes marcadores respectivamente: CD3, CD4, Foxp3 e CCR4 - CD3, CD4 e CD69 e CD3, CD8 E CD69. Também foi realizada a marcação e caracterização fenotípica de células dendríticas com os seguintes marcadores: CD11b, CD11c, F4/80, MHCII e CD103. As células foram lavadas e ressuspensas em Fc block (para bloquear ligações inespecíficas) por 30 minutos a 4°C e em seguida com 1.0 µg de anticorpos monoclonais específicos para os marcadores determinados acima e conjugados com os determinados fluorocromos por 30 minutos à 4°C. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS-BSA e centrifugadas a 250 x g por 10 minutos. Os leucócitos foram adquiridos em FACS Canto II (Becton & Dickson®, San Jose, CA, USA) e as análises foram feitas usando o software FlowJo (Treestar®).

2.8 Extração do RNA e construção do cDNA

A extração do RNA total das amostras do colón intestinal e linfonodo cecal foram realizadas utilizando-se kit de extração de RNA (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de Rnase, sendo então armazenadas a -80 C. A concentração de RNA foi determinada utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). A construção do cDNA foi realizada a partir da padronização das amostras de RNA na concentração de 1 µg e a conversão em cDNA foi realizada utilizando o *High capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA) segundo as recomendações do fabricante.

2.9 Reação de PCR em tempo real

A expressão quantitativa dos genes das moléculas GPR41, GPR43, GPR109a, Foxp3, CCR4, Aldh1a2, IDO-1, Muc-1, Muc2, IL-22, ZO-1 e CCL17 foram analisados por PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBR Green em um aparelho GeneAmp

7700 (Applied Biosystems, USA). O cDNA sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagente SYBR Green, como determinado pelo fabricante. A reação básica de amplificação foi realizada da seguinte maneira: 95° C 10 min, 95° C 15 segundos (Desnaturação), 60° C 30 segundos (Anelamento), 72° C 30 segundos (extensão), 95° C 15 segundos, 60° C 1 minuto, 95° C 15 segundos.

2.10 Quantificação de citocinas por ELISA

As dosagens das citocinas IL-6, TGF- β , IL-10 e CCL17 nos tecidos pancreáticos foram analisadas pelo método de Elisa. A quantificação foi realizada nos homogenatos dos tecidos em solução contendo inibidores de protease, utilizando Kits específicos para tais dosagens, de acordo com as especificações do fabricante (Kits Biolegend).

2.11 Quantificação de insulina por ELISA

A dosagem de insulina foi quantificada no soro dos camundongos pelo método de ELISA utilizando kits específicos para tais dosagens, de acordo com as especificações do fabricante (Kits Alpco).

2.12 Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta por cromatografia gasosa

As amostras fecais extraídas do cólon foram pesadas em tubos de 1,5 ml, trituradas e homogeneizadas em 100 μ l de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 40 mg de cloreto de sódio, 20 mg de ácido cítrico, 40 μ l de ácido clorídrico 1 M e 200 μ l de butanol. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 min e centrifugados a 18.000 \times g por 15 min. O sobrenadante foi transferido para microtubos e 1 μ l foi injetado no cromatógrafo de gás. Para quantificar AGCC, uma curva de calibração para a faixa de concentração de 0,015–1 mg / ml foi construída. As análises cromatográficas foram realizadas usando um sistema Agilent 6850 com software ExChrom, equipado com um amostrador líquido automático 7683B, um detector de ionização de chama (DIC) (Agilent Technologies, EUA) e uma sílica fundida capilar RTX-WAX (Restec Corporation, EUA) com dimensões de 60 m \times 0,25 mm de diâmetro interno (DI) revestido com uma camada de 0,15 μ m de espessura de polietilenoglicol. A temperatura inicial do forno era de 100° C (2 minutos), que foi aumentada para 200° C a uma taxa de 15° C / min (5 minutos). A temperatura do DIC foi mantida a 260° C e as taxas de

fluxo de H₂, ar e o gás de reposição N₂ foram 35, 350 e 25 ml / min, respectivamente. Volumes de amostra de 1 µl foram injetados a 260 ° C usando uma proporção de divisão de aproximadamente 25: 1. O nitrogênio foi usado como gás de arraste a 25 ml / min. Essa técnica foi padronizada por (FELLOWS *et al.*, 2018).

2.13 Quantificação de bactérias intestinais por qPCR

O DNA do conteúdo fecal foi obtido utilizando o kit DNeasy PowerSoil (Qiagen). A quantificação dos diferentes filos, gêneros e espécies bacterianas como: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, *Clostridium Cluster IV*, *Clostridium Cluster XIVa*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila*. Foi feita usando primers de genes rRNA 16S universal ou taxon-específicos usando o PCR quantitativo (qPCR). As diferenças (Δ CT) entre os valores de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar) de Eubacteria e grupos bacterianos específicos foram usadas para obter níveis normalizados de cada grupo bacteriano ($2^{-\Delta$ CT). A abundância relativa de cada grupo bacteriano foi obtida após normalização com os grupos controles.

2.14 Imunofluorescência no tecido pancreático

Para a reação de imunofluorescência, os tecidos pancreáticos foram congelados em uma mistura de álcool polivinílico, polietileno glicol diluídos em PBS (OCT-Tissue Tek) e cortados em criostato a 14 µm. Em seguida, as lâminas foram lavadas 2x com PBS. Após isso, foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com uma solução de PBS 1x contendo BSA1% e Triton x100 a 0,2% por 1 hora. Foi utilizado o anticorpo CCR4-APC diluídos em PBS 1x contendo BSA1% e Triton x100 a 0,1% por 2 horas em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas 5x com PBS1x por 5 minutos cada lavagem. As lâminas foram montadas com DAPI/fluormount pingando uma gota na lamínula e vertendo a lâmina com o corte voltado para cima.

2.15 Análise estatística

As análises dos resultados obtidos foram realizadas por meio dos seguintes testes estatísticos: média \pm erro padrão da média (EPM); análise de variância (ANOVA) seguida pelos pós teste de Tukey para experimentos contendo acima de 2 grupos ou Teste t para experimentos contendo apenas 2 grupos experimentais. Tais análises foram

realizadas no software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) e foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de P igual ou inferior a 0.05.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito do prebiótico inulina na modulação da microbiota intestinal e na imunopatogenia do DM1 no modelo experimental induzido por STZ.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Acompanhar os parâmetros clínicos e metabólicos associados à progressão do DM1;
- 3.2.2 Determinar o escore do processo inflamatório (insulite) e o grau de destruição das ilhotas pancreáticas;
- 3.2.3 Quantificar o hormônio insulina no soro como marcador de função das ilhotas pancreáticas no DM1;
- 3.2.4 Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) no tecido pancreático, colón e conteúdo fecal;
- 3.2.5 Quantificar e imunofenotipar as subpopulações de linfócitos Treg nos linfonodos pancreáticos (LPs) e cecal (LC);
- 3.2.6 Analisar a expressão gênica de proteínas de junção celular, mucinas e marcação de muco no intestino (cólon);
- 3.2.7 Correlacionar com a abundância relativa de bactérias da microbiota intestinal nas fezes em nível de filos, gêneros e espécies bacterianas.

4. RESULTADOS

4.1 A suplementação com inulina conferiu efeito preventivo contra o desenvolvimento do DM1 em camundongos após administração com STZ

Inicialmente, notamos que a dieta com inulina (STZ+INU) se mostrou eficaz e melhorou consideravelmente os parâmetros clínicos e metabólicos do DM1 (Figura 1), impedindo a incidência da doença (Figura 1D) e mantendo os níveis glicêmicos menores comparado aos animais com dieta padrão que se tornaram hiperglicêmicos (STZ+DP) (Figura 1A, 1B e 1C). Também observamos que os animais que receberam a inulina tiveram ganho de peso, enquanto os animais que receberam o STZ+DP perderam peso ao final do experimento (Figure 1E). Em paralelo, analisamos o infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas e observamos que os animais que foram suplementados com inulina (STZ+INU) tiveram maior preservação das ilhotas pancreáticas e menor grau de insulite invasiva quando comparado com o grupo diabético após STZ (Figura 1G, 1H). Além disso, mostramos que esses animais apresentavam maior marcação para insulina em relação aos animais administrados com STZ que consumiram a dieta padrão (STZ+DP) por meio da técnica de imunohistoquímica (Figura 1G e 1I). Também observamos que os animais STZ+DP apresentaram redução significativa das concentrações de insulina sérica comparado aos animais VH+DP, porém houve aumento significativo da insulina nos animais STZ+INU (Figura 1J).

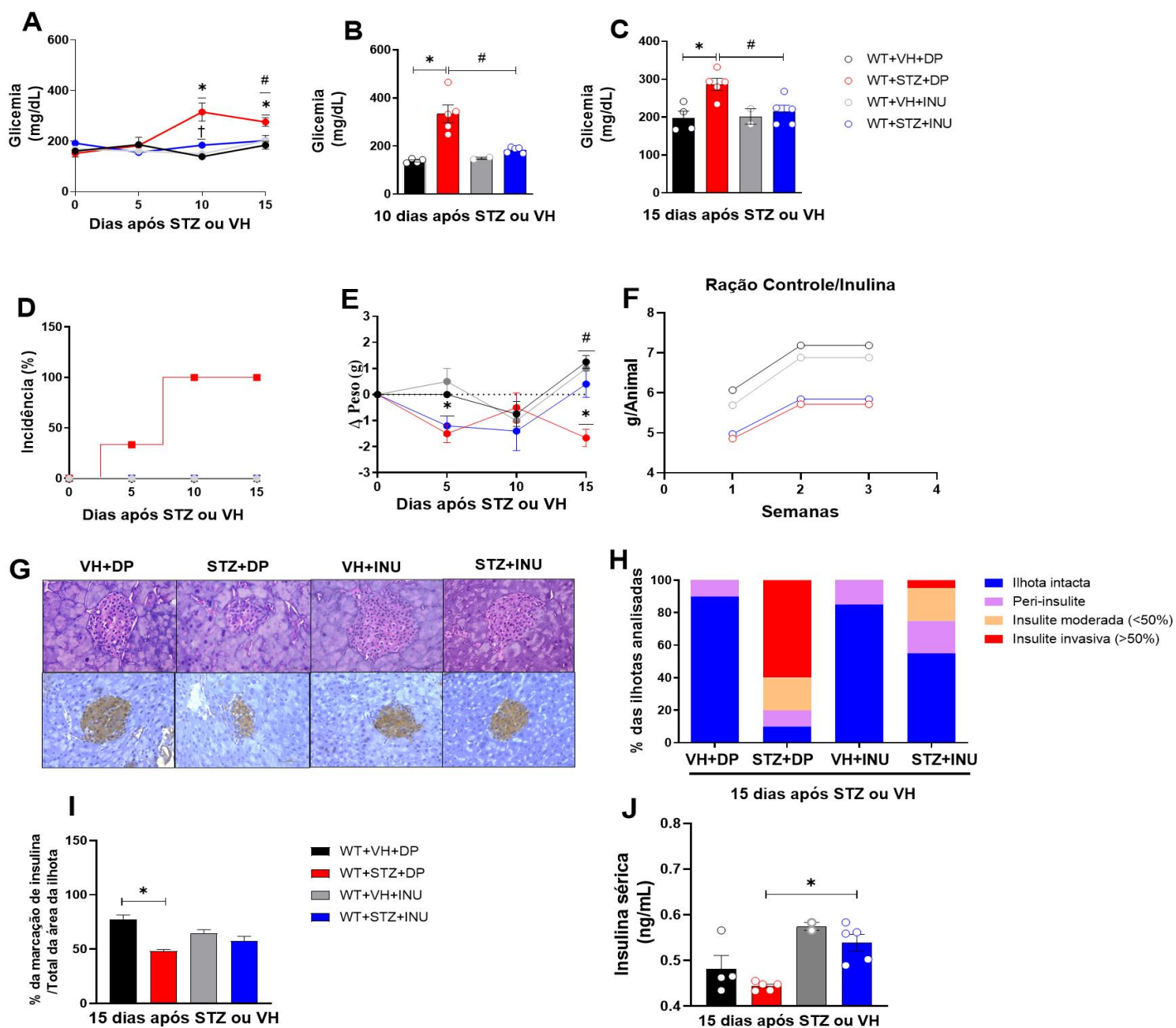


Figura 1. Parâmetros clínicos, metabólicos e histopatológicos do DM1 após suplementação com prebiótico inulina. (A) Cinética do nível glicêmico de camundongos WT com ou sem suplementação com inulina após administração do veículo (VH) ou estreptozotocina (STZ). (B) Dosagem da glicemia após 10 dias de STZ ou VH. (C) Dosagem da glicemia após 15 dias de STZ ou VH. (D) Incidência do DM1 em camundongos WT. (E) Variação do peso após STZ ou VH. (F) Consumo da ração controle ou inulina. (G, H e E) Marcação para insulina por imunohistoquímica, avaliação do escore de insulite pancreática ou morfometria das ilhotas pancreáticas marcadas para insulina. (J) Níveis séricos de insulina após 15 dias de desenvolvimento do DM1. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; †, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU, #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

4.2 A suplementação com inulina ocasionou aumento da população de linfócitos Treg CCR4+ nos linfonodos pancreáticos (LP) e no pâncreas de animais após administração com STZ

Ao realizar a imunofenotipagem por citometria de fluxo dos LP dos camundongos (Figura 2A), observamos que tanto o grupo STZ+DP quanto o grupo STZ+INU apresentaram aumento da porcentagem e número absoluto de células Treg Fcpx3⁺CD4⁺ em relação aos seus respectivos controles VH+DP e VH+INU (Figura 2B e 2C). Porém, ao analisar as células Treg expressando o receptor CCR4, o qual está relacionado a migração de linfócitos para tecidos periféricos inflamados (Figura 3A), não encontramos diferenças estatísticas significantes na porcentagem (Figura 3B) podemos observar tendência de aumento das células Fcpx3⁺CCR4⁺ nos LPs de camundongos WT+STZ+INU em relação aos WT+STZ+DP (Figura 3C).

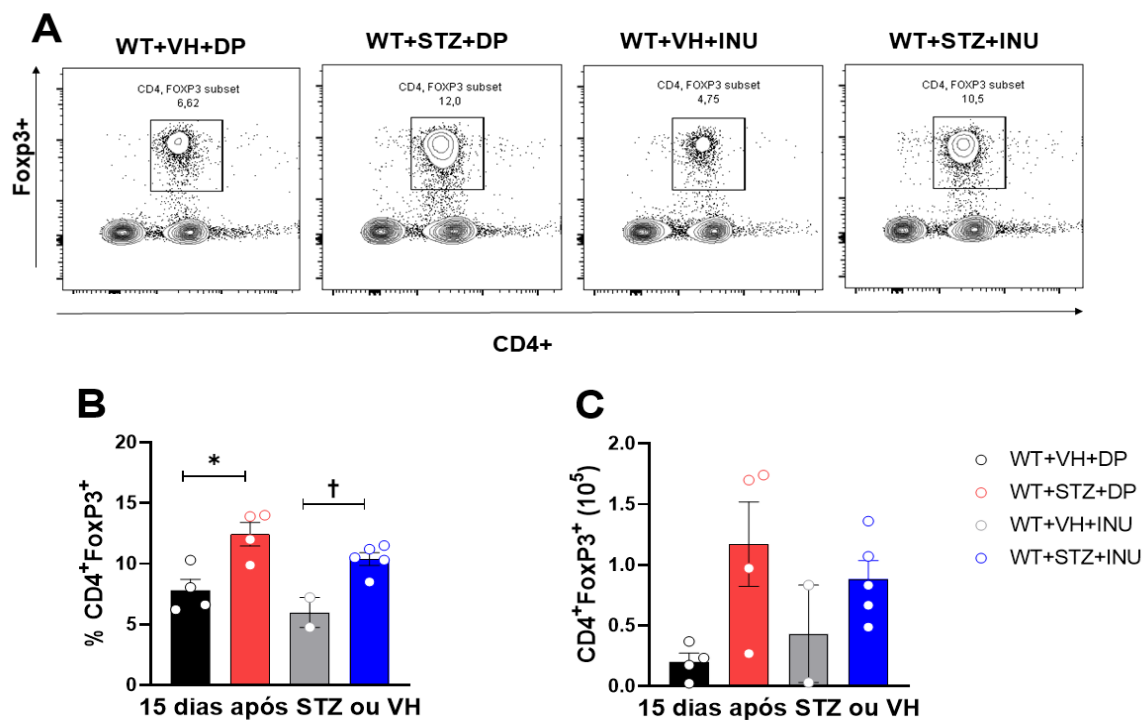


Figura 2. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg CD4⁺Foxp3⁺ nos LP após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A) Representativo da população de células Treg CD4⁺ Foxp3⁺ nos LP. (B) Porcentagem de células Treg CD4⁺ Foxp3⁺. (C) Número absoluto de células Treg CD4⁺Foxp3⁺. Os resultados foram expressos como média ± SEM *, p<0,05 vs WT+VH+DP; †, p<0,05 vs WT+VH+INU; #, p<0,05 vs WT+STZ+DP. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

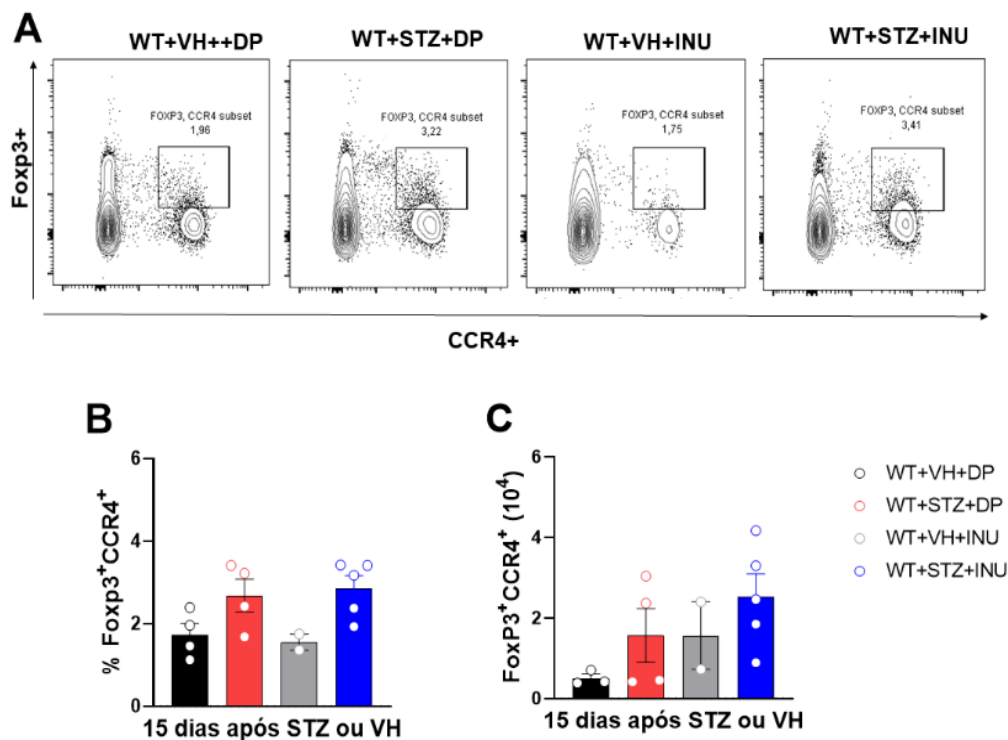


Figura 3. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$ nos LP após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A) Representativo da população de células Treg $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$ nos LP. (B) Porcentagem de células Treg $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$. (C) Número absoluto de células Treg $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; †, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP;. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística

Interessantemente, a marcação de células $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$ nas ilhotas pancreáticas por microscopia confocal evidenciou que camundongos STZ+DP tiveram menor migração de células $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$ (marcação em amarelo) em relação aqueles não-diabéticos (VH+DP). Entretanto, nos animais STZ+INU houve um evidente restabelecimento do influxo desta população celular (marcação em amarelo) nas ilhotas pancreáticas (Figura 4A). Após observar o aumento das células $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$, também fomos dosar a quimiocina ligante de CCR4 (CCL17) no pâncreas dos animais por meio da técnica de ELISA. Apesar de não ser significativo, podemos verificar que os animais STZ+INU apresentaram elevação das concentrações de CCL17 no tecido pancreático (Figura 4E), em relação aos grupos STZ+DP e VH+INU. Desta forma, podemos inferir que a suplementação com insulina favoreceu a migração das células $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$ via CCL17 para o pâncreas desses animais. Em seguida, constatamos que os animais STZ+INU apresentavam aumento significativo da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β comparados aos animais STZ+DP (Figura 4C e 4D). Porém, não observamos diferenças significativas na produção de IL-6 (Figura 4B). Esses achados indicam que os animais suplementados com inulina exibiram um ambiente antiinflamatório no pâncreas, o qual pode estar limitando a destruição das células beta produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas e conferindo proteção ao DM1.

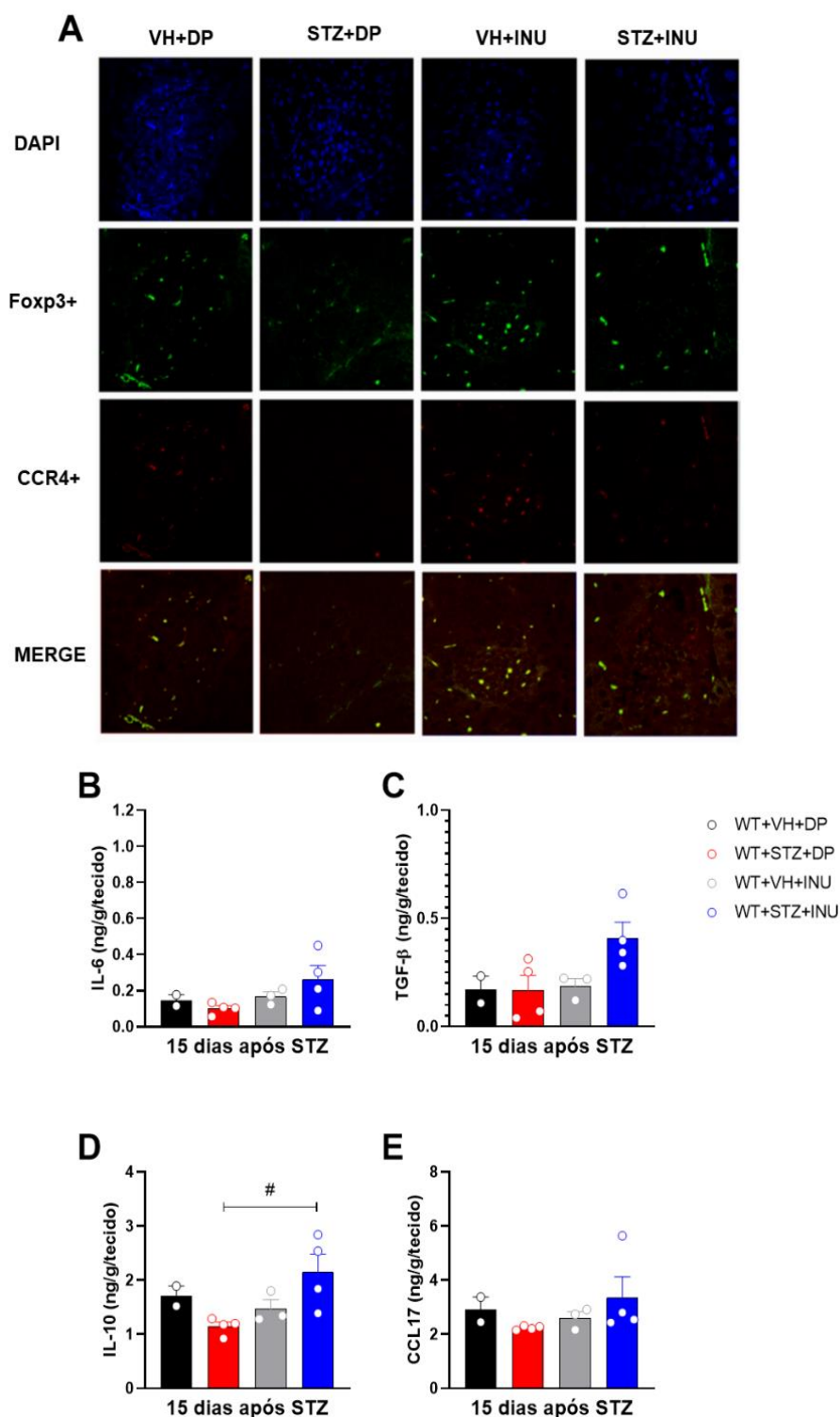


Figura 4. Dosagem de quimiocinas e citocinas no tecido pancreático e análise de células Foxp3+CCR4+ nas ilhotas pancreáticas após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A) Imunofluorescência confocal das ilhotas pancreáticas para células positivas para Foxp3 (verde) e do receptor CCR4 (vermelho). (B-E) Quantificação de IL-6, TGF- β , IL-10 e CCL17 no pâncreas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos como SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; †, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

4.3 A suplementação com inulina inibiu o infiltrado inflamatório e aumentou a produção de muco no cólon de camundongos após administração com STZ

Com o intuito de investigar como a suplementação com inulina interferiu no desenvolvimento do DM1, investigamos a organização estrutural e funcional do intestino (cólon) dos animais suplementados ou não com a inulina, já que este órgão recebe efeitos diretos da suplementação por ser o local de metabolização das fibras alimentares solúveis. Inicialmente, analisamos o comprimento do cólon intestinal dos animais (Figura 5A-5D), usando como referência alguns trabalhos mostrando que no contexto de inflamação intestinal ocorre a redução do comprimento do órgão (TIAN *et al.*, 2019; ZHANG, L. *et al.*, 2020). Entretanto, não foram observadas alterações entre o comprimento do cólon entre os grupos STZ+DP e STZ+INU (Figura 5E). Já ao analisar os cortes histológicos (Figura 5F) do colón dos animais diabéticos por coloração de hematoxilina e eosina (HE), observamos que os animais STZ+INU apresentaram menor infiltrada inflamatória intestinal e maior marcação de muco por ácido periódico de Schiff (PAS) (Figura 5G) em relação aos animais STZ não suplementados. Interessantemente, ao analisar a expressão genica de moléculas que poderiam estar envolvidas na melhora da inflamação intestinal (Figura 6A) dos camundongos STZ+INU, verificamos o aumento significativo da expressão gênica de MUC-1 (Figura 6B) em relação ao grupo VH+INU, mas sem alteração na expressão de MUC-2 (Figura 6C). De forma interessante, não observamos diferença na expressão de ZO-1, um marcador de permeabilidade intestinal, em comparação com camundongos que receberam ou não a suplementação. Em paralelo, detectamos aumento significativo da citocina IL-22 em ambos animais STZ+DP e STZ+INU comparados aqueles controles (VH+DP e VH+INU). Porém, não houve diferenças estatísticas entre os grupos STZ sem ou com suplementação (Figura 6F). Embora a expressão de CCL17 estar aumentada significativamente nos animais VH+INU, não detectamos alterações entre os animais STZ+DP e STZ+INU (Figura 6E), o que reforça a nossa proposição de que a migração das células Foxp3+CCR4+ está sendo direcionada para o pâncreas.

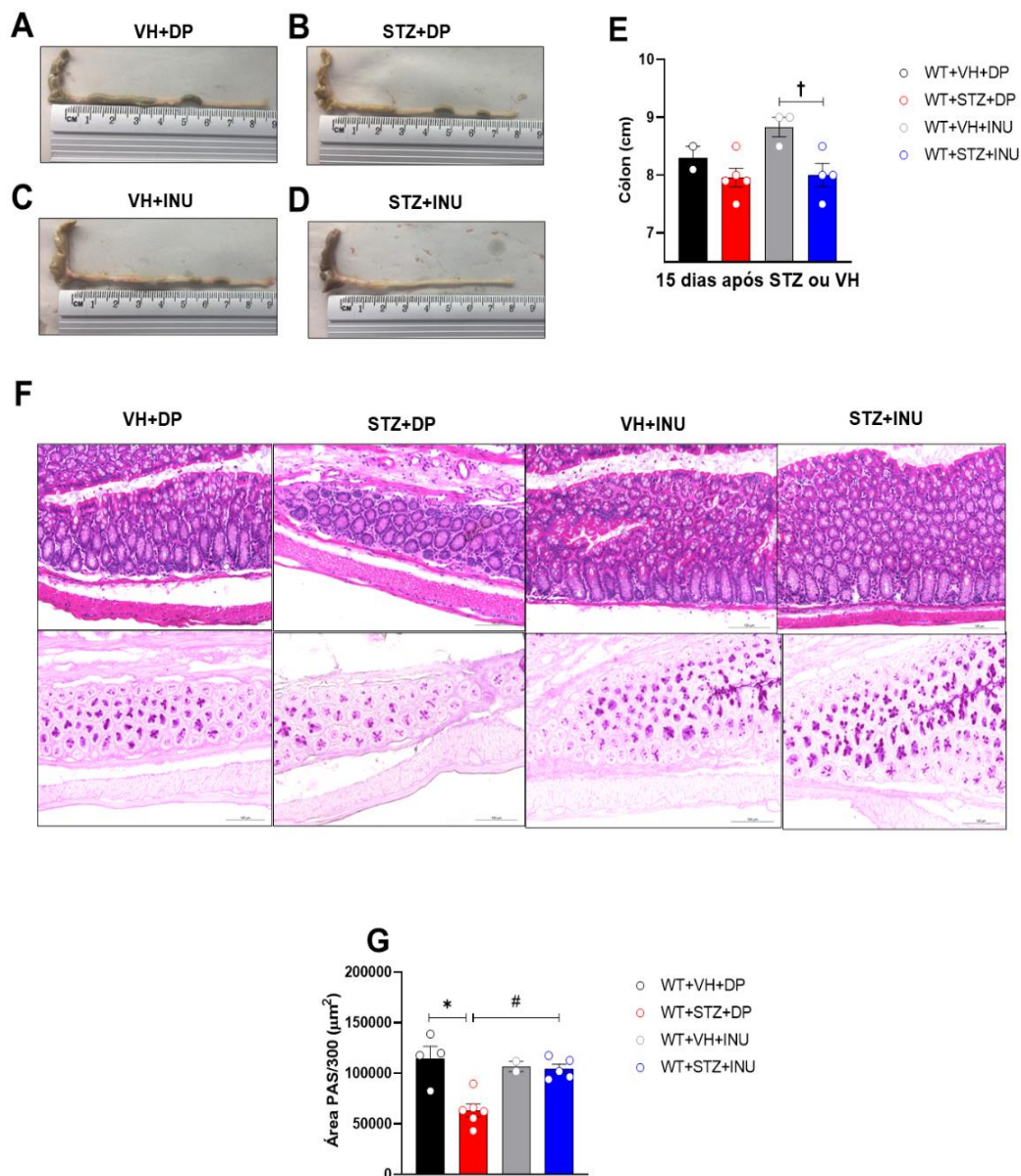


Figura 5. Histologia e produção de muco no cólon intestinal após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A-D) Foto macroscópica do cólon intestinal. (E) Análise do comprimento do cólon. (F) Fotomicrografia do cólon intestinal após coloração com HE. Expressão de muco após coloração com PAS. (G) Análise morfométrica das células marcadas com PAS. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP; †, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

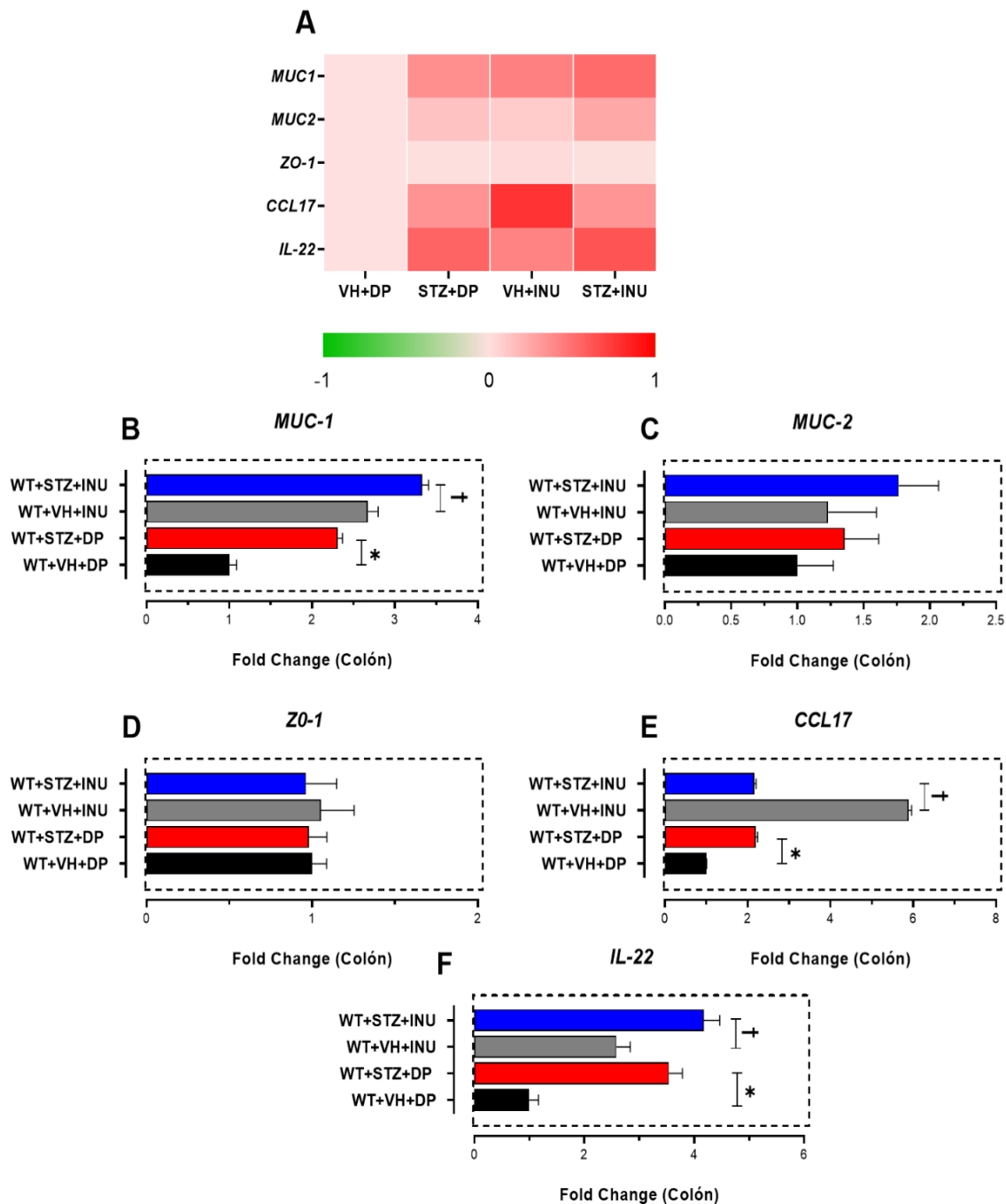


Figura 6. Expressão gênica de mucinas, ZO-1, CCL17 e IL-22 no colón intestinal após suplementação com o prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A) Heatmap representativo do perfil de expressão. (B-F) Expressão relativa de moléculas no cólon avaliadas por RT-PCR. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP; †, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

4.4 A suplementação com inulina causou prevalência dos filos Firmicutes e Verrucomicrobia na microbiota intestinal após administração com STZ

Ao analisar a abundância relativa dos principais filos bacterianos que compõe a microbiota intestinal (Figura 7F), comprovamos que os animais STZ+INU apresentaram uma microbiota intestinal com aumento de Firmicutes (Figura 7B) e Verrucomicrobia (Figura 7E) em comparação com os animais STZ+DP, sugerindo que a suplementação com inulina foi capaz de modular a microbiota intestinal desses animais para um perfil de bactérias benéficas com potencial probiótico. Interessantemente, o filo das Actinobactérias mostrou-se reduzido nos camundongos STZ+INU em relação aos STZ+DP (Figura 7A). Porém ao analisar possíveis alterações a nível de gêneros e espécies bacterianas dentro de cada filo (Figura 8), observamos que os animais suplementados com a inulina apresentaram maior abundância do gênero *Bifidobacterium* (Figura 8C) em relação aos diabéticos que receberam a dieta padrão. Também notamos aumento do Clostridium Cluster IV (Figura 8A), um grupo de bactérias relacionadas a produção de butirato pela metabolização de frutanos de inulina e da espécie bacteriana *Akkermansia muciniphila* (Figura 8D) relacionada com a modulação da inflamação intestinal e manutenção da integridade da mucosa intestinal.

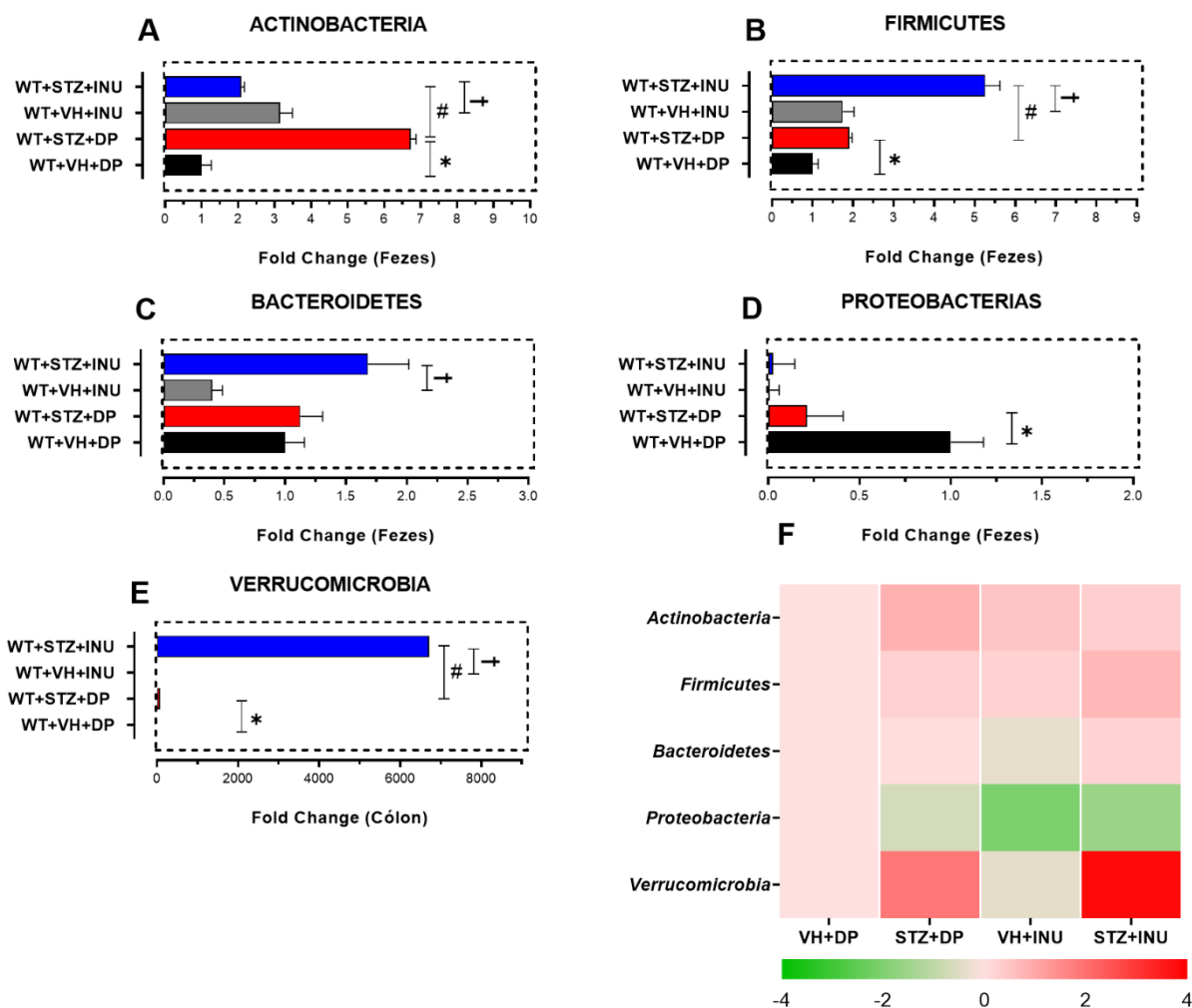


Figura 7. Perfil da microbiota intestinal à nível de filós após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A-E) Abundância relativa dos filós bacterianos no conteúdo fecal avaliada por RT-PCR. (F) Heat-map representativo dos filós bacterianos analisados. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP; †, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

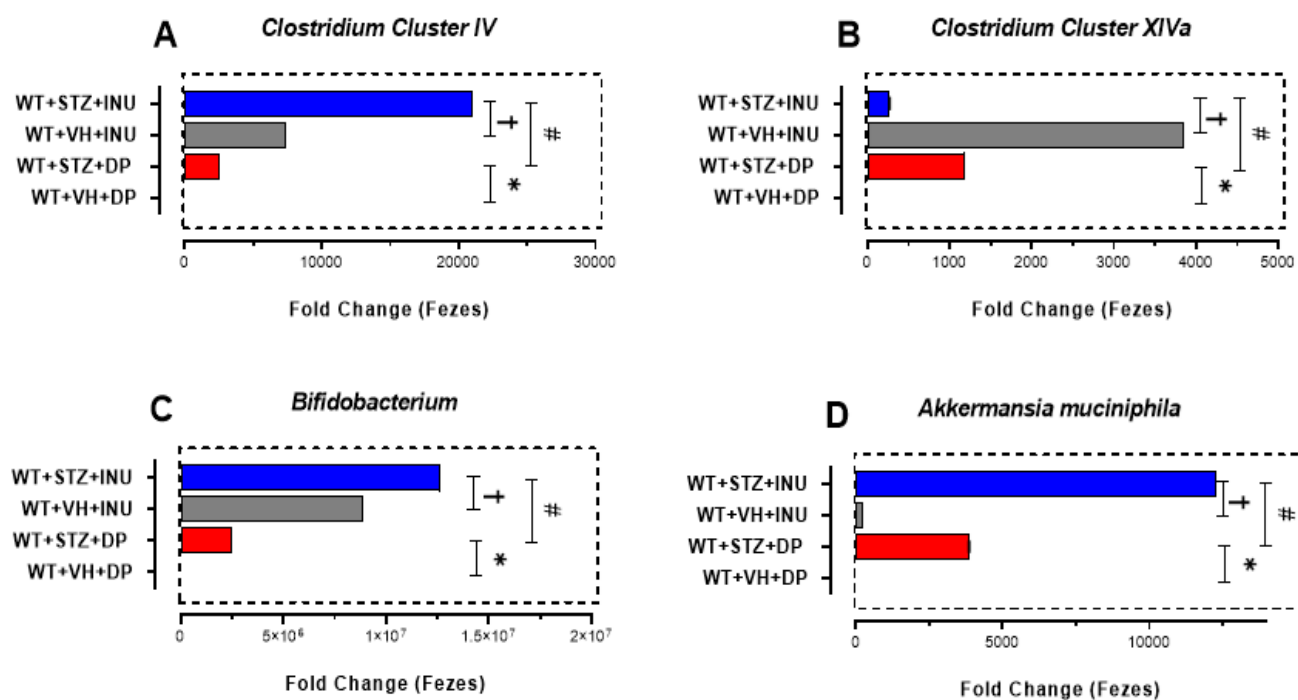


Figura 8. Análise da microbiota fecal após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A-D) Abundância relativa de comunidades bacterianas produtores de butirato e acetato no conteúdo fecal avaliada por RT-PCR. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP; +, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

4.5 A suplementação com inulina potencializou a expressão gênica de receptores de AGCC e marcadores de células Treg e DCs tolerogênicas no linfonodo cecal (LC)

Após observarmos que a microbiota intestinal dos animais que receberam a inulina apresentava abundância maior de bactérias produtoras de AGCC, quantificamos a expressão gênica de receptores associados aos AGCC, marcadores de Treg e DCs tolerogênicas nas células presentes no LC por RT-PCR (Figura 9H). De fato, observamos que os animais que receberam a dieta com a inulina apresentaram aumento significativo da expressão dos receptores *GPR41*, *GPR43* e *GPR109A* associados aos AGCC em relação aqueles STZ que receberam a dieta padrão (Figura 9A-9C). Além disso, houve aumento significativo da expressão gênica de marcadores associados as células Treg+ sendo eles, *Foxp3+* e *CCR4+* (Figuras 9D e 9E) e DCs tolerogênicas. *IDO-1* e *ALDH1e2* (Figura 9F e 9G) nos animais que receberam a dieta com inulina em relação aos que receberam a dieta padrão após administração de STZ. Sendo assim, estes achados indicam que a dieta com inulina está ocasionando nos animais um perfil tolerogênico nos linfonodos regionais do intestino grosso.

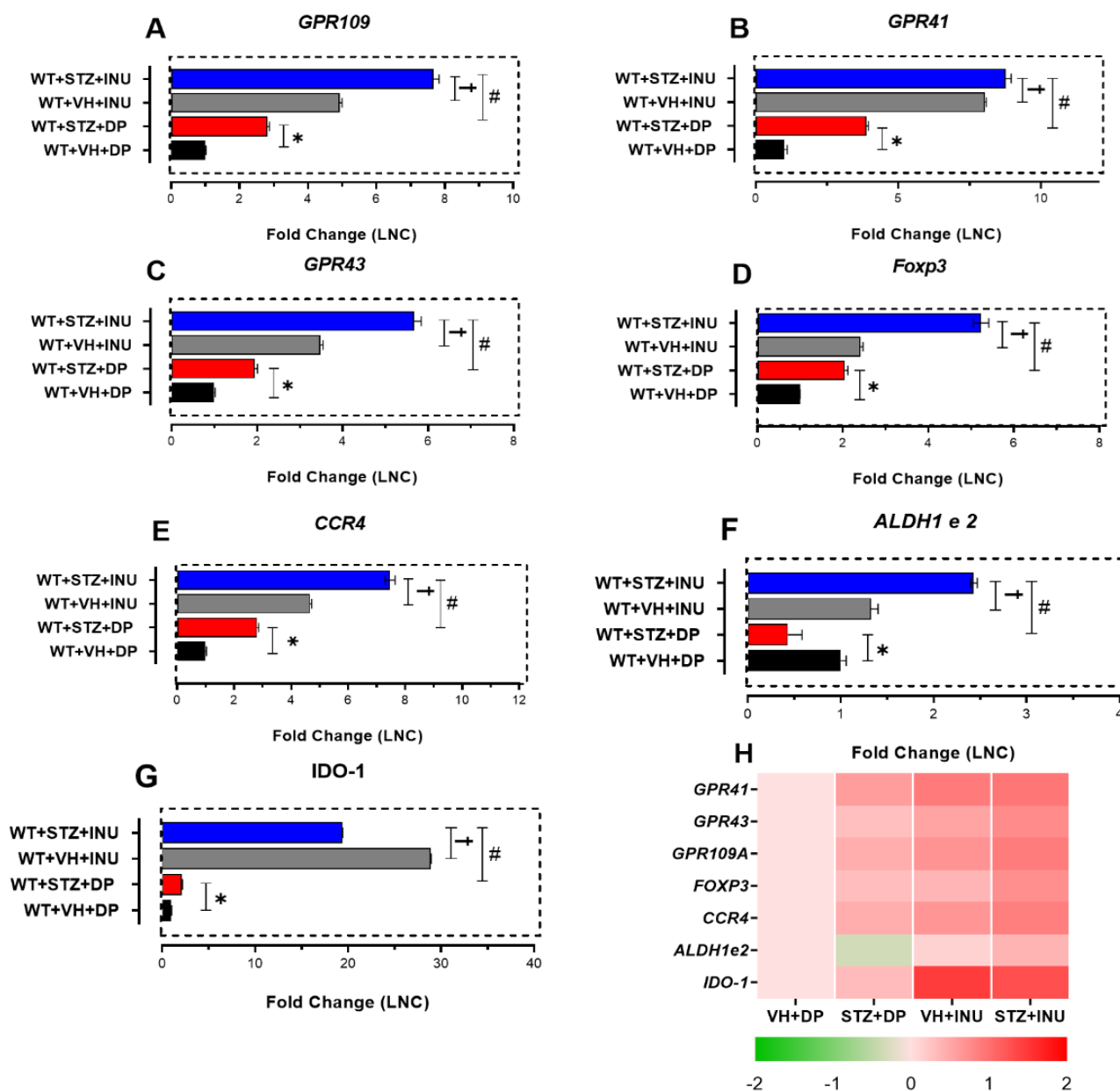


Figura 9. Análise da expressão de receptores de AGCC, marcadores de Treg e DCs após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A-C) Expressão de receptores dos AGCC. (D e E) Expressão de marcadores associados as células Treg. (F-G) Expressão de marcadores associados as DCs tolerogênicas. (H) Heat-map representativo da expressão gênica das moléculas observadas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP; †, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

4.6 A suplementação com inulina reduziu a população de células Treg no LC de camundongos após administração com STZ

Na análise imunofenotípica dos linfócitos Treg $CD4^+Foxp3^+$ no linfonodo cecal por citometria de fluxo, detectamos um aumento significativo da porcentagem das células Treg $CD4^+Foxp3^+$ nos animais WT+STZ+INU em relação ao grupo STZ+DP (Figuras 10A e 10B). Porém, ao analisar o número absoluto dessas células, constatamos redução significativa do número absoluto dessas células entre os mesmos grupos mencionado acima. (Figura 10C).

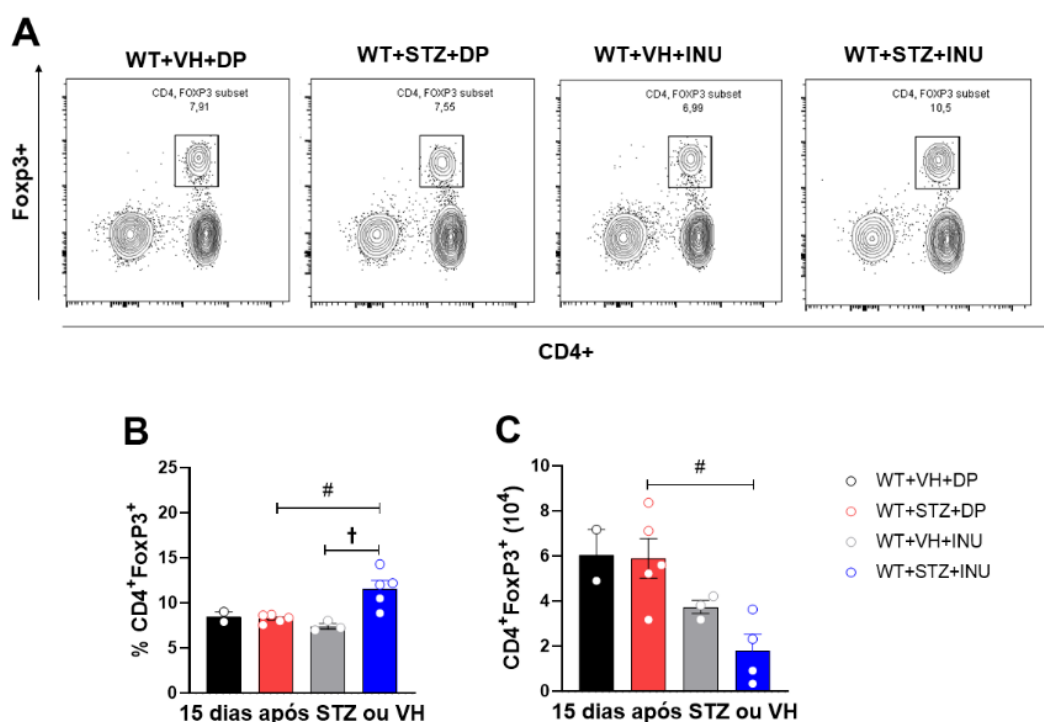


Figura 10. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg $CD4^+Foxp3^+$ nos LC após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A) Representativo da população de células Treg $CD4^+Foxp3^+$. (B) Porcentagem de células Treg $CD4^+Foxp3^+$. (C) Número absoluto de células Treg $CD4^+Foxp3^+$. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP; +, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

4.7 A suplementação com inulina causou reduzida geração de células $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$ no linfonodo cecal de camundongos após administração com STZ

A fim de realizar uma análise mais detalhada das células Treg (Figura 11A) por citometria de fluxo, realizamos a quantificação de células $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$ no LC, uma vez que nossa hipótese é que essas células estariam sendo geradas no colón e migrando para o pâncreas. Apesar de não haver diferença estatística na porcentagem e número absoluto nos animais STZ+INU, houve uma nítida redução do número absoluto dessas células no linfonodo cecal em comparação com os animais STZ+DP (Figuras 11B e 11C). Diante disso, uma explicação plausível é que a inulina atua na imunorregulação do DM1 promovendo um eixo intestino-pâncreas, no qual as células Treg são diferenciadas nos linfonodos do intestino e migram de maneira sítio específica via CCR4 para as ilhotas pancreáticas, já que observamos maior número dessas células no tecido pancreático dos animais STZ+INU em relação aos animais STZ+DP.

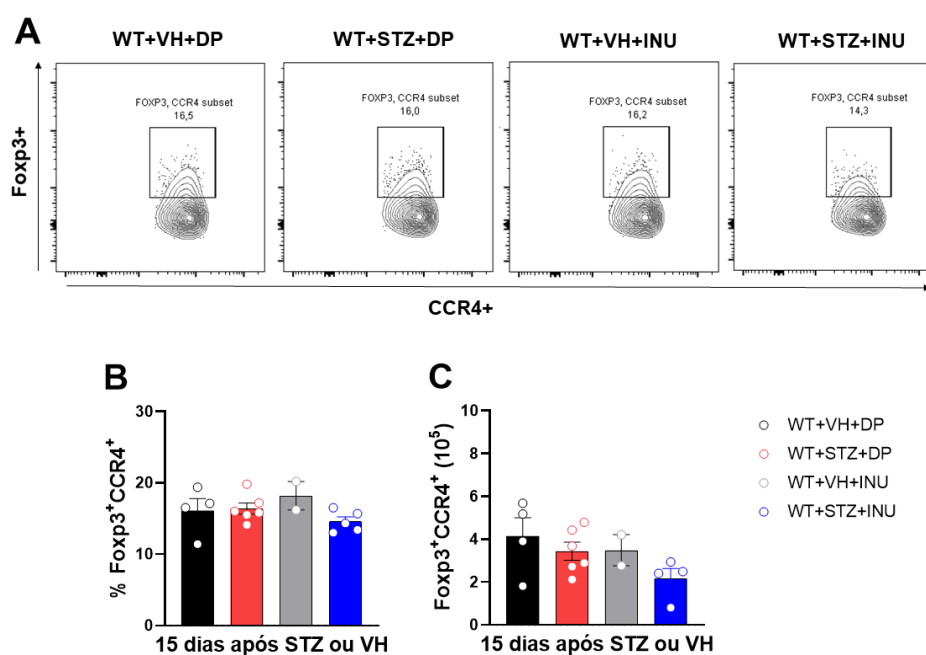


Figura 11. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$ nos LC após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A) Representativo da população de células Treg $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$. (B) Porcentagem de células Treg $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$. (C) Número absoluto de células Treg $\text{Foxp3}^+\text{CCR4}^+$. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP; †, $p < 0,05$ vs WT+VH+INU. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

4.8 Suplementação com inulina ocasionou aumento da produção de butirato no conteúdo fecal de camundongos após administração com STZ

Utilizando a técnica de cromatografia gasosa, foi realizado a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta, acetato, butirato e propionato no conteúdo fecal do cólon dos animais após 15 dias da administração de STZ ou VH. Conforme ilustrado na Figura 12, foi detectado aumento significativo da produção de butirato no conteúdo fecal do cólon dos camundongos suplementados com inulina em relação aqueles diabéticos sem a suplementação (Figura 12C). Todavia, não detectamos diferenças significativas na produção de acetato ou propionato entre os diferentes grupos experimentais (Figuras 12A e 12B).

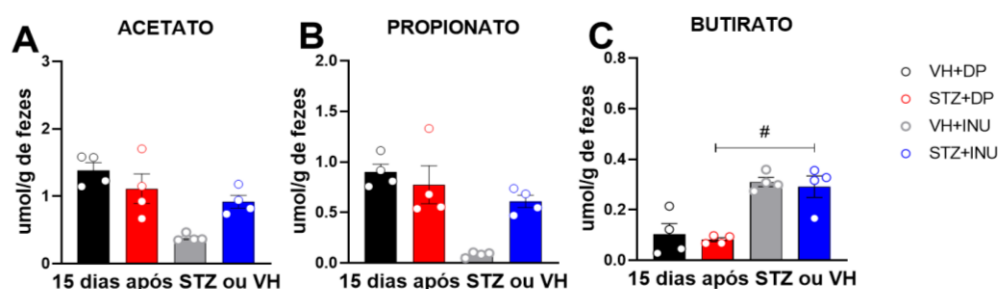


Figura 12. Produção de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes após suplementação com prebiótico inulina em animais administrados com STZ ou VH. (A) Quantificação de acetato; (B) propionato ou (C) butirato no conteúdo fecal do cólon por cromatografia gasosa. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs WT+VH+DP; #, $p < 0,05$ vs WT+STZ+DP. O teste ANOVA one-way com post-teste de Tukey foi usado para análise estatística.

4.9 A suplementação com butirato conferiu proteção contra o desenvolvimento do DM1 em camundongos após STZ

Como mostrado anteriormente, a suplementação com o prebiótico inulina aumentou de forma significativa os níveis de butirato nas fezes dos camundongos que foram suplementados com a fibra em comparação aos camundongos não suplementados, gerando efeito indireto via produção de butirato no desenvolvimento da doença. Com isso, pensamos em utilizar esse ácido graxo afim de mostrar seu efeito direto na prevenção do desenvolvimento da doença em nosso modelo experimental.

Utilizando o mesmo esquema de suplementação realizado com a inulina, porém com o butirato, podemos observar que esse AGCC foi capaz de prevenir o desenvolvimento da doença (Figura 13D) melhorando os níveis glicêmicos dos animais STZ+BUT em relação os STZ+H₂O no dia 15 após a indução da doença (Figuras 13A-13C). Também observamos que os animais que receberam butirato apresentaram maior preservação das ilhotas pancreáticas apresentando maior número de ilhotas pancreáticas intactas e maior marcação para insulina no pâncreas em relação aos animais não suplementados (Figuras 13G-13I), porém na dosagem da insulina não foi observado diferenças estatísticas entre os dois grupos (Figura 13J). Diferente do observado com a suplementação com a inulina, não observamos variação de peso entre os grupos (Figura 13E), porém o consumo de água foi maior no grupo diabético que não foi suplementado com o butirato (Figura 13F).

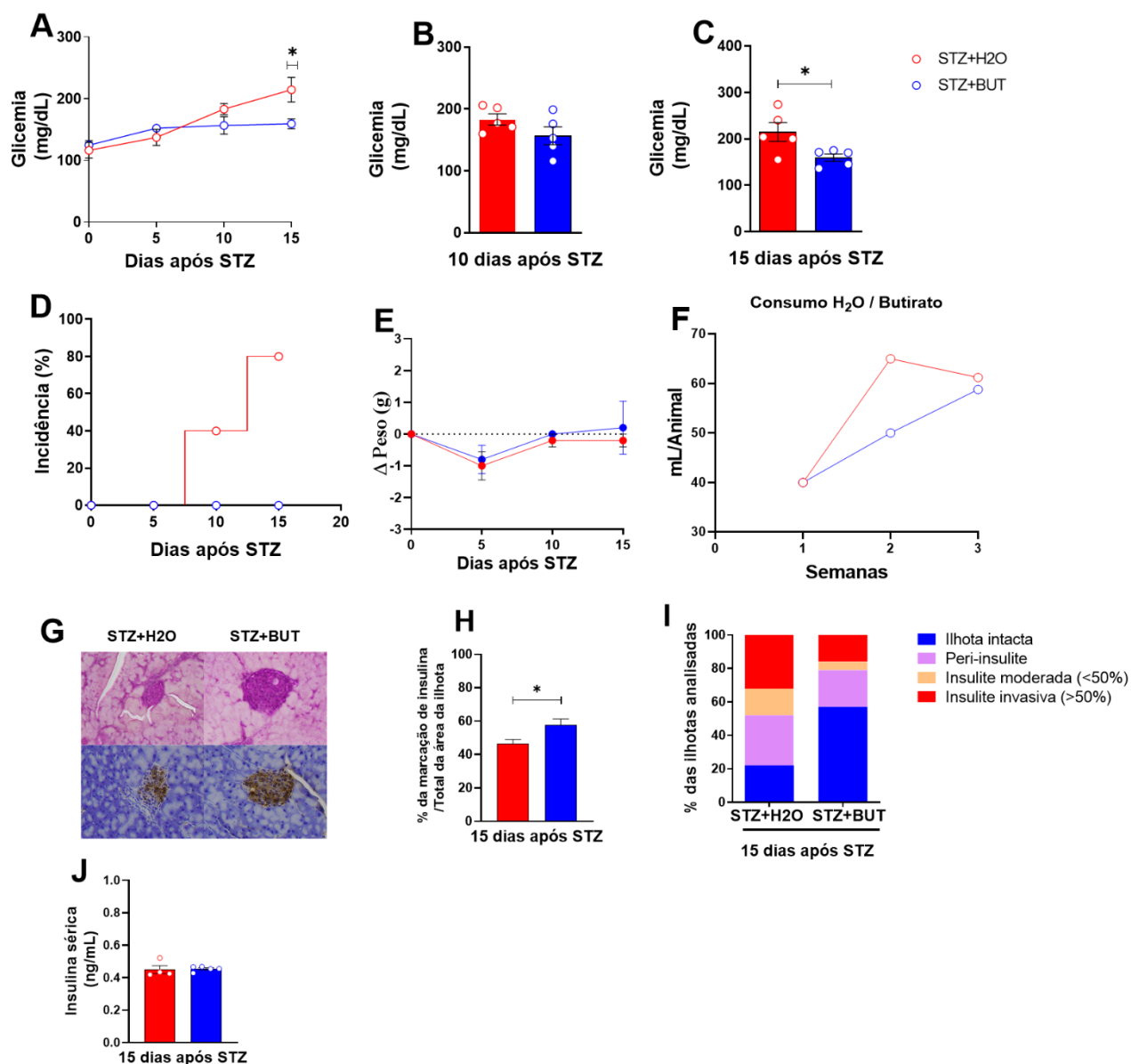


Figura 13. Parâmetros clínicos, metabólicos e histopatológicos do DM1 após suplementação com butirato. (A) Cinética do nível glicêmico de camundongos WT com ou sem a suplementação com butirato após administração com STZ. (B) Dosagem da glicemia após 10 dias de STZ. (C) Dosagem da glicemia após 15 dias de STZ. (D) Incidência do DM1 em camundongos WT com ou sem butirato. (E) Variação do peso após STZ. (F) Consumo de água em mL com ou sem butirato. (G, H e I) Avaliação do escore de insulite pancreática por HE e marcação para insulina por imunohistoquímica. (J) Níveis séricos de insulina após 15 dias de desenvolvimento do DM1. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs STZ+H₂O. O teste t foi usado para análise estatística.

4.10 A suplementação com butirato diminuiu o número de células Treg CD4⁺Foxp3 com aumento de células expressando CCR4 nos LP de camundongos após STZ

Ao analisar a imunofenotipagem por citometria de fluxo dos LP de camundongos após a suplementação com butirato com diferentes marcadores (Figura 14A e 14D), observamos que os camundongos suplementados apresentaram diminuição das células Treg CD4⁺Foxp3⁺ tanto em porcentagem (Figura 14B) quanto em número absoluto (Figura 14C). Já na análise da população de Tregs expressando Foxp3⁺CCR4, observamos aumento da porcentagem dessas células (Figura 14F) e redução do número absoluto (Figura 14G) com aumento da média da intensidade de fluorescência (MIF) de CCR4 (Figura 14E e 14H).

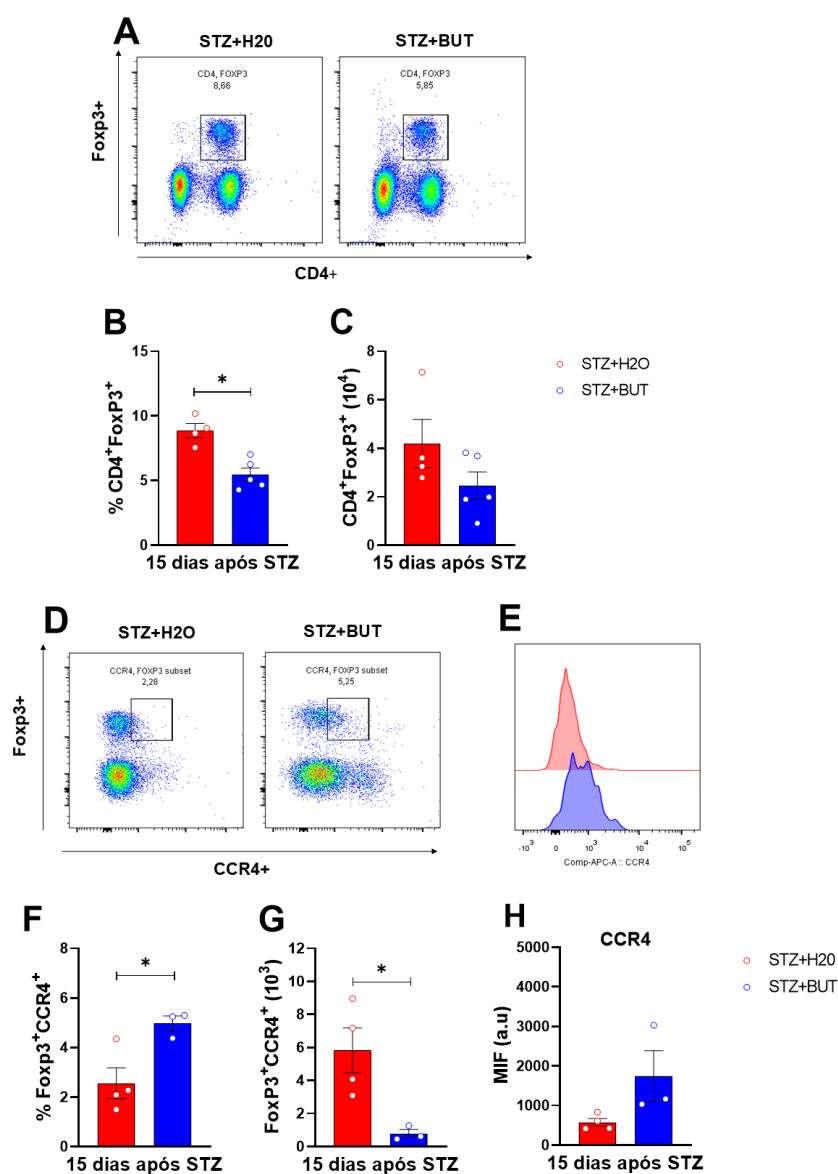


Figura 14. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg CD4⁺Fcyp3⁺ e Fcyp3⁺ CCR4⁺ nos LP após suplementação com butirato em animais administrados com STZ. (A) Representativo da população de células Treg CD4⁺Fcyp3⁺. (B) Porcentagem de células Treg CD4⁺Fcyp3⁺. (C) Número absoluto de células Treg CD4⁺Fcyp3⁺. (D) Representativo da população de células Treg Fcyp3⁺CCR4⁺. (E) Representativo da média da intensidade de fluorescência (MIF) de CCR4. (F) Porcentagem de células Treg Fcyp3⁺CCR4⁺. (G) Número absoluto de células Treg Fcyp3⁺CCR4⁺. (H) Estatística do MIF de CCR4⁺. Os resultados foram expressos como média ± SEM *, p<0,05 vs STZ+H2O. O teste t foi usado para análise estatística.

4.11 A suplementação com butirato reduziu o número de células CD4+ e CD8+ patogênicas nos LP de camundongos após STZ

Na análise imunofenotípica das células CD4+CD69+ e CD8+CD69+ patogênicas nos LP dos camundongos após STZ (Figuras 15A e 15D), podemos observar que a suplementação com butirato foi eficaz em reduzir estas células nos animais STZ+BUT tanto em porcentagem (Figuras 15B e 15E), quanto em número absoluto (Figuras 15C e 15F) em comparação com os animais STZ+H₂O. Interessantemente, esses dados mostram que os animais STZ+BUT tiveram menor população de linfócitos T patogênicos ativados, o que provavelmente resultou no controle do desenvolvimento da doença mostrado anteriormente.

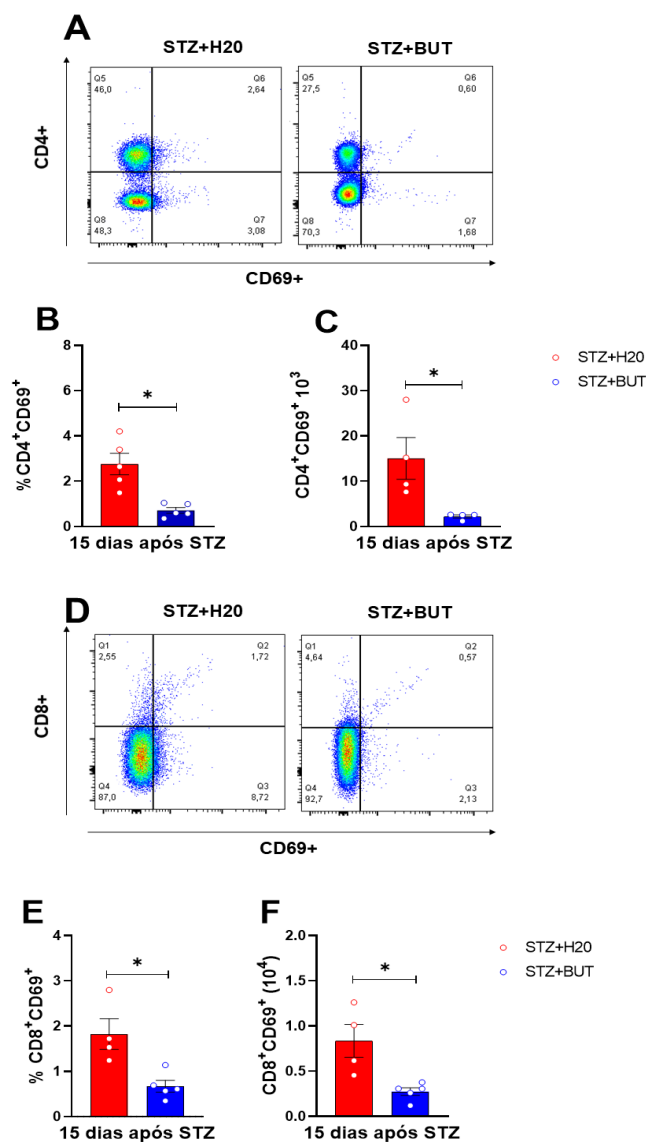


Figura 15. Porcentagem e número absoluto de linfócitos CD4⁺CD69⁺ e CD8⁺CD69⁺ nos LP após suplementação com butirato em animais administrados com STZ. (A) Representativo da população de linfócitos CD4⁺CD69⁺. (B) Porcentagem de linfócitos CD4⁺CD69⁺. (C) Número absoluto de linfócitos CD4⁺CD69⁺. (D) Representativo da população de linfócitos CD8⁺CD69⁺. (E) Porcentagem de linfócitos CD8⁺CD69⁺. (G) Número absoluto de linfócitos CD8⁺CD69⁺. Os resultados foram expressos como média ± SEM *, p<0,05 vs STZ+H2O. O teste t foi usado para análise estatística.

4.12 A suplementação com butirato tende a aumentar o número de células Foxp3+CCR4 no LC de camundongos após STZ

Ao realizar a análise imunofenotípica das células Treg CD4⁺Foxp3⁺ (Figura 16A), apesar de não haver diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, observamos que os camundongos suplementados com butirato apresentaram aumento do número absoluto dessas células em relação aos que não receberam o AGCC (Figura 16C). Além disso, também observamos tendência de aumento do número absoluto das células Foxp3+CCR4+ (Figura 16G) no LC de camundongos STZ+BUT em relação aos STZ+H₂O com aumento significativo do MIF de CCR4 (Figura 16H) nos camundongos suplementados. Com isso, mostramos que a suplementação com butirato é capaz de estimular a geração de células Treg que expressam CCR4⁺ nos linfonodos cecais em relação aos STZ+H₂O.

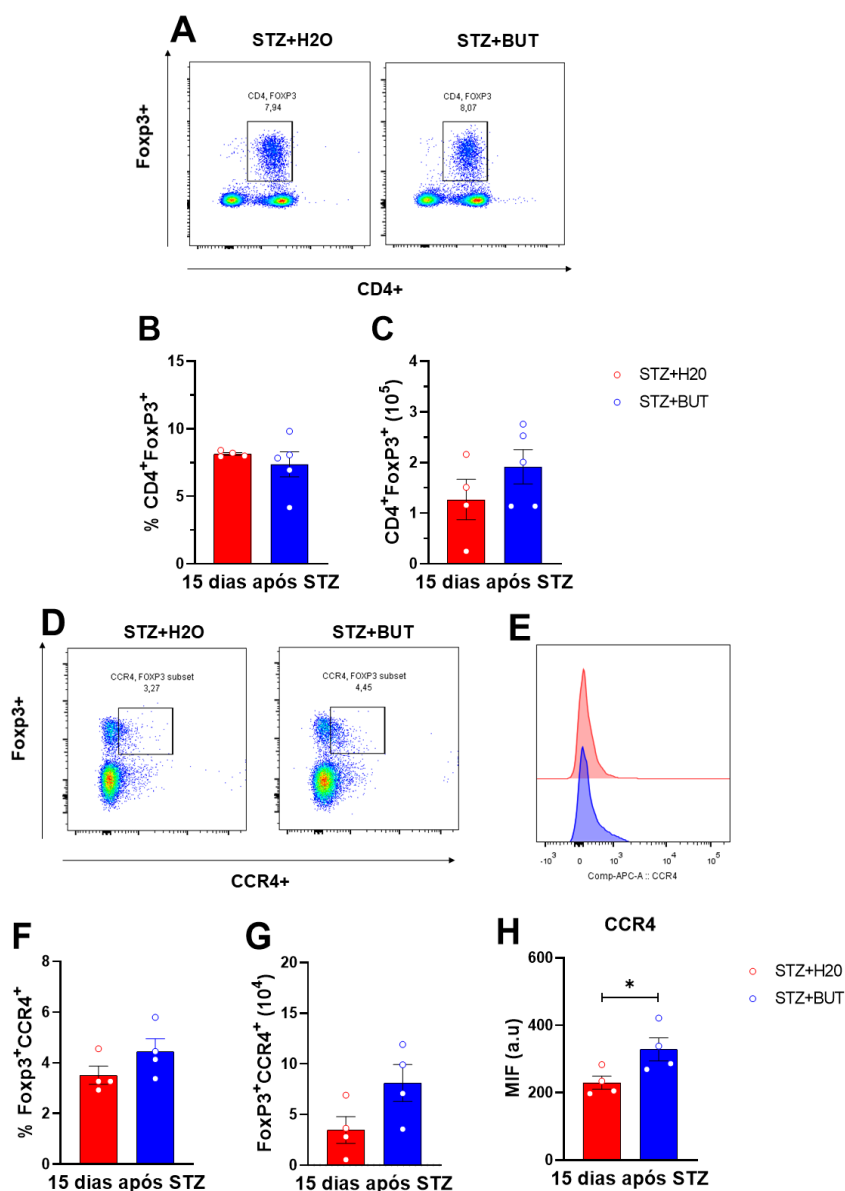


Figura 16. Porcentagem e número absoluto de linfócitos Treg CD4⁺Foxp3⁺ e Foxp3⁺ CCR4⁺ no LC após suplementação com butirato em animais administrados com STZ. (A) Representativo da população de células Treg CD4⁺Foxp3⁺. (B) Porcentagem de células Treg CD4⁺Foxp3⁺. (C) Número absoluto de células Treg CD4⁺Foxp3⁺. (D) Representativo da população de células Treg Foxp3⁺CCR4⁺. (E) Representativo da média da intensidade de fluorescência (MIF) de CCR4. (F) Porcentagem de células Treg Foxp3⁺CCR4⁺. (G) Número absoluto de células Treg Foxp3⁺CCR4⁺. (H) Estatística do MIF de CCR4⁺. Os resultados foram expressos como média ± SEM *, p<0,05 vs STZ+H2O. O teste t foi usado para análise estatística.

4.13 A suplementação com butirato aumentou o número de células dendríticas tolerogênicas nos camundongos após STZ

Por fim, após analisar o perfil das células Tregs nos LP e LC dos camundongos após indução do DM1, fomos investigar se nos animais suplementados com butirato estaria ocorrendo o aumento de células dendríticas tolerogênicas (Figura 17E), importantes para a indução de células Treg nos linfonodos drenantes intestinais (K *et al.*, 2003), uma vez que a nossa hipótese de que essas células são induzidas pelas DCs nesse compartimento e migram para o pâncreas dos camundongos STZ+BUT. De modo interessante, observamos que a suplementação com butirato foi capaz de aumentar o número absoluto das células tolerogênicas CD103+CD11b+ nos LC dos camundongos STZ+BUT em relação os STZ+H₂O (Figura 17B). Como observado na Figura 17D, também observamos uma tendência de aumento do número absoluto das células dendríticas CD103+CD11b-.

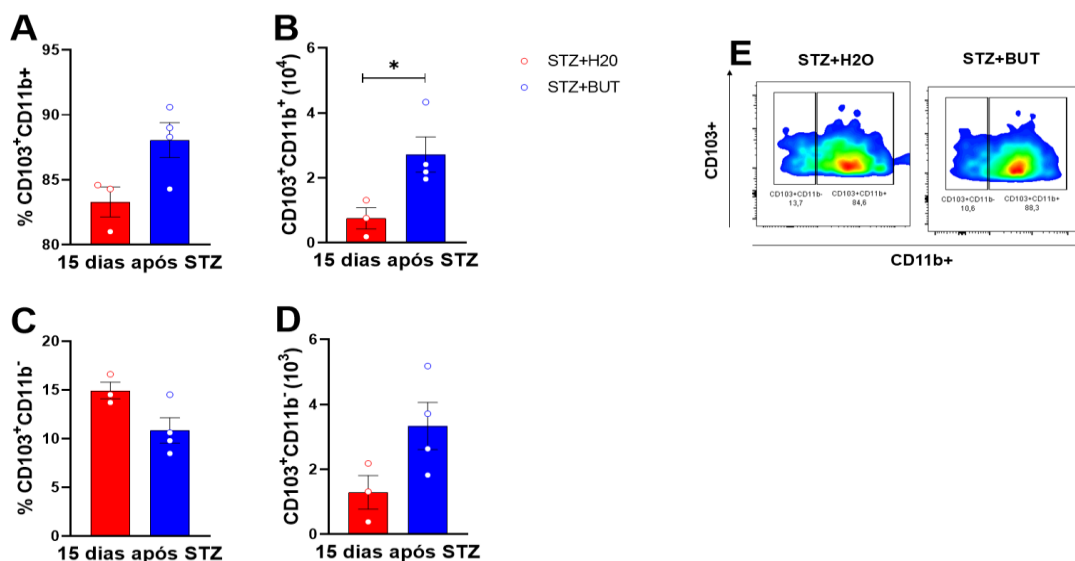


Figura 17. Porcentagem e número absoluto de células dendríticas tolerogênicas CD103+CD11b+ e CD103+CD11b- no LC de camundongos após suplementação com butirato em animais administrados com STZ. (A) Porcentagem de células dendríticas CD103+CD11b+. (B) Número absolutos de células dendríticas CD103+CD11b+. (C) Porcentagem de células dendríticas CD103+CD11b-. (D) Número absoluto de células dendríticas CD103+CD11b-. (E) Representativo das populações de células dendríticas tolerogênicas. Os resultados foram expressos como média \pm SEM *, $p < 0,05$ vs STZ+H2O. O teste t foi usado para análise estatística.

5. DISCUSSÃO

A dieta apresenta um impacto crucial na saúde humana, sendo um componente essencial na modulação da microbiota intestinal (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). Alguns cereais, frutas e vegetais são ricos em fibras alimentares solúveis, que são consideradas como prebióticos, o que significa que são metabolizadas seletivamente por microrganismos presentes na microbiota intestinal e conferem benefícios à saúde e prevenção de doenças inflamatórias (FOROUHI; UNWIN, 2019). Além disso, a metabolização de fibras alimentares solúveis é benéfica para a prevenção de várias doenças metabólicas e alguns trabalhos mostram que fibras solúveis por meio da fermentação bacteriana e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) são importantes em conferir esta proteção (ANDOH; TSUJIKAWA; FUJIYAMA, 2005; KOH *et al.*, 2016).

Nossos resultados mostraram que a utilização do prebiótico inulina causou efeito preventivo na progressão do DM1 em modelo murino induzido pelo STZ. Este efeito benéfico foi comprovado devido a melhora dos parâmetros clínicos, metabólicos e hormonais que são característicos da doença, como: ganho de peso corporal, controle do índice glicêmico, normalização dos níveis de insulina sérica e redução do grau de insulite. Essas características também foram observadas por (ZOU *et al.*, 2021), em um modelo crônico de desenvolvimento do DM1 (56 dias), o qual mostrou que a suplementação com a inulina também foi capaz de proteger camundongos administrados com STZ do surgimento da doença em comparação com camundongos que ingeriram uma dieta controle. O uso da inulina em humanos também foi observado e de acordo com HO *et al.* (2019) publicaram um estudo que avaliaram o efeito do prebiótico inulina no controle glicêmico de crianças com DM1, observaram aumento dos níveis de peptídeo C, que é relacionado com a melhora da função das células β pancreáticas, e que clinicamente desencadeia a melhora do controle glicêmico dos pacientes. A oligofrutose que é um oligossacarídeo derivado da inulina que também apresentou resultados promissores no controle glicêmico no contexto do DM1. Esse carboidrato melhorou os níveis de insulina, aumentou a taxa de proliferação das células β pancreáticas produtoras de insulina e o conteúdo de insulina pancreática (CHAN *et al.*, 2016). Esses dados demonstraram que a inulina apresenta uma promissora abordagem

nutricional em reduzir os níveis glicêmicos tanto em modelo experimental quanto em humanos.

Posteriormente, fomos analisar possíveis mecanismos imunológicos pelos quais a suplementação com o prebiótico inulina estaria protegendo os animais do desenvolvimento do DM1. Apesar de não haver diferença estatística, encontramos aumento significativo da porcentagem das células Treg CD4⁺Foxp3⁺ nos linfonodos pancreáticos (LPs) de animais STZ+DP e STZ+INU, assim como aumento do número absoluto dessas células. Interessantemente, ao investigar as células Treg Foxp3⁺CCR4⁺ nos LPs, observamos o aumento dessas células em camundongos STZ+INU, o que pode ser fator fundamental no controle do desenvolvimento da doença nesse modelo experimental, possivelmente favorecendo um estado de tolerância neste compartimento e suprimindo a ativação/função efetora de linfócitos citotóxicos CD8⁺, CD4⁺ do padrão Th1 ou Th17 patogênicos. Além disso, na imunofluorescência das ilhotas pancreáticas, podemos observar que as células Treg Foxp3⁺CCR4⁺ aumentaram nos camundongos STZ+INU associado com elevada produção da quimiocina CCL17 em relação ao grupo STZ+DP. É importante destacar que a quantidade destas células neste grupo sem suplementação com inulina foi bem escassa. Corroborando com nossos resultados, MÜLLER-GRAFF *et al.* (2018), também observaram redução de células Foxp3⁺ no pâncreas de camundongos após receber STZ e que apresentavam hiperglicemia, o que vai de acordo com nossos resultados de imunofluorescência por microscopia confocal. Já FRANÇOZO *et al.*(2019) em um modelo de infecção por Coxsackievirus que apresenta tropismo ao pâncreas (HUBER; RAMSINGH, 2004), demonstraram que camundongos deficientes do receptor CCR4 apresentaram maior destruição e inflamação pancreática com diminuição de células Treg expressando esse receptor e expressão da quimiocina CCL17. Essa migração de células Treg parece ser um mecanismo fundamental na homeostasia do pâncreas em processos inflamatórios. Sendo assim, é plausível que este é o mecanismo pelo qual é a suplementação com a inulina desempenha seu efeito na indução de um perfil tolerogênico local (cólon) e distal (tecido pancreático), controlando a inflamação nas ilhotas pancreáticas que resulta no início do DM1 no modelo induzido por STZ.

Em seguida, tivemos o intuito de investigar o perfil imunológico intestinal de camundongos STZ suplementados ou não com a inulina a fim de correlacionar possíveis

efeitos anti-inflamatórios intestinais que poderiam prevenir ou mesmo retardar o desenvolvimento da doença. Estudos em modelos experimentais e humanos mostraram diferenças na composição da microbiota intestinal no decorrer do DM1 (BRUGMAN *et al.*, 2006;VAARALA, 2012). Em uma análise geral, avaliando os principais filos bacterianos que compõe a microbiota intestinal, evidenciamos que a microbiota intestinal dos camundongos STZ+INU apresentavam uma microbiota mais saudável, enriquecida dos filos Firmicutes e Verrucomicrobia. O filo Firmicutes tem como principais bactérias probióticas o gênero *Lactobacillus*, que contribuem para inibir a fixação de bactérias Gram-negativas, como a *Echerichia coli* enteropatogênica no trato gastrointestinal (WILSON; PERINI, 1988), contribuindo para o aumento da expressão de genes relacionados a produção de muco no intestino, como a mucina do tipo 2 (MUC-2) constituindo assim uma barreira física contra a invasão de bactérias patobiontes (DE MORENO DE LEBLANC *et al.*, 2008). Já o filo Verrucomicrobia, tem como representantes membros do gênero *Akkermansia*, sendo a principal espécie a *Akkermansia muciniphila* que vem sendo associada a promoção da saúde intestinal e na melhora da condição metabólica em indivíduos obesos e no diabetes tipo 2 (DM2) (EVERARD *et al.*, 2013). Seu principal mecanismo de ação decorre da sua capacidade em renovar a camada de muco no hospedeiro, ajudando a normalizar a endotoxemia metabólica e o metabolismo do tecido adiposo (BELZER; DE VOS, 2012; DERRIEN; BELZER; DE VOS, 2017). Adicionalmente, é uma bactéria mucolítica que utiliza as mucinas intestinais como fonte de carbono e nitrogênio, produzindo os AGCC acetato e propionato e dessa forma, nutrindo as células epiteliais do hospedeiro e auxiliando na integridade da mucosa intestinal (ALARD *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017). De modo geral, a razão entre Firmicutes/Bacteroidetes tem sido relacionada a estados de doença (LEY *et al.*, 2006) e ao observar a abundancia relativa desses dois filos nos animais STZ+DP, podemos observar que nesses animais essa relação é menor do que nos animais STZ+INU. De acordo com Goffau et al. (DE GOFFAU *et al.*, 2013) em crianças com DM1, a microbiota intestinal é alterada em quantidade e diversidade (disbiose intestinal) em comparação com aquela de controles saudáveis. O processo de disbiose intestinal leva a desregulação metabólica, e estudos em animais experimentais mostram que a prevalência de bactérias Gram-negativas contribui para inflamação intestinal e perda da integridade das proteínas de junção do epitélio intestinal (CANI *et al.*, 2007)(CANI *et al.*, 2009). Nosso grupo já demonstrou que a depleção da microbiota

intestinal com antibióticos de amplo espectro em camundongos que receberam STZ conferiu resistência ao desenvolvimento do DM1, com menor translocação bacteriana nos LPs, enfatizando a contribuição da microbiota intestinal na imunopatogênese da doença (COSTA *et al.*, 2016).

Em seguida, ao investigarmos o linfonodo cecal (LC) dos animais STZ após suplementação com a inulina, observamos que as células presentes nesse linfonodo apresentavam alta expressão gênica de receptores que podem ser ativados pelos AGCC, dentro os quais podemos citar o GPR41, GPR43 e GPR109A, que são essenciais para a regulação da resposta imune tanto no intestino, quanto em outros tecidos extra-intestinais (FERNANDES *et al.*, 2014; MACIA *et al.*, 2015). De acordo ZOU *et al.* (2018), a utilização da inulina em um modelo de dieta rica em gordura, foi reportado que a suplementação aumentou a expressão de GPR43, melhorou a síndrome metabólica induzida pela dieta. Também, esta intervenção nutricional acarretou na elevada produção de IL-22 pelo epitélio intestinal, proliferação dos enterócitos e expressão de genes antimicrobianos de maneira dependente da microbiota intestinal, demonstrando a modulação do microambiente intestinal pela fermentação da fibra. Dando prosseguimento a análise das células presentes no LC, também observamos aumento da expressão gênica do fator de transcrição Foxp3⁺ e do receptor CCR4⁺. Todavia, ao analisar por citometria de fluxo as células Treg Foxp3⁺CCR4⁺, observamos uma tendência de diminuição dessas células no linfonodo cecal, nos levando a pensar na hipótese de que essas células estariam migrando para alguma região. Assim, ao realizar a quantificação das principais quimiocinas ligantes do receptor CCR4⁺, comprovamos acentuado aumento de CCL17 no tecido pancreático dos animais STZ+INU em relação aos STZ+DP. Também observamos aumento da expressão dos genes indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO-1) e aldeído desidrogenase 1 membro A2 (Aldh1e2) que são marcadores associados a células dendríticas tolerogênicas (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2017; PARK *et al.*, 2012). Sendo assim essas evidências sugerem que a diferenciação e migração de células Treg via CCR4 mediada por células dendríticas é o provável mecanismo envolvido no controle do desenvolvimento do DM1 nos animais que receberam a suplementação prebiótica.

Em seguida, dosamos os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) tais como acetato, butirato e propionato por cromatografia gasosa no conteúdo fecal do cólon dos

animais suplementados, para identificar qual seria o ácido graxo de cadeia curta que poderia estar induzindo esse perfil de células imunes tolerogênicas no intestino, além de garantir maior integridade da mucosa intestinal. Sabe-se que os AGCC podem atenuar a inflamação por meio da diminuição da permeabilidade intestinal, reduzindo a inflamação sistêmica devido à redução de endotoxinas circulantes (KIM, Y. A.; KEOGH; CLIFTON, 2018). Logo, observamos que o AGCC que está aumentado de maneira significativa nas fezes dos animais STZ+INU foi o butirato. Segundo Arpaia et al. (ARPAIA *et al.*, 2013), esse ácido graxo produzido por bactérias comensais por meio da fermentação de fibras solúveis apresentam uma grande capacidade de induzir a diferenciação de células Treg. Interessantemente, esse aumento de butirato correlaciona-se com o aumento do *Clostridium Cluster IV* nos camundongos STZ+INU em relação aos STZ+DP, que compreende um grupo de espécies bacterianas produtoras de butirato via fermentação de oligofrutos e também utilizando-se do acetato produzido por bactérias do gênero *Bifidobacterium* para produzir esse AGCC (BARCENILLA *et al.*, 2000; MOENS; DE VUYST, 2017; SCOTT; DUNCAN; FLINT, 2008). Também observamos o aumento do gênero *Bifidobacterium* nos animais suplementados com a inulina, que produzem preferencialmente o acetato, mas que pelo mecanismo de alimentação cruzada (*cross-feeding*), essas bactérias probióticas podem utilizar o acetato como co-substrato para posterior produção de butirato (RIVIÈRE *et al.*, 2016).

Por fim, realizamos a suplementação dos camundongos com o AGCC butirato (5mg/kg) afim de observar seus efeitos de maneira direta no desenvolvimento do DM1, já que nos animais STZ+INU esse ácido graxo estava aumentado. Assim, a suplementação com butirato se mostrou eficaz na prevenção do desenvolvimento do DM1 induzido por STZ, com perfis clínicos e metabólicos semelhantes aos observados com a suplementação com o prebiótico inulina. Interessantemente, ao analisar as células Treg CD4+Foxp3+ nos LP dos camundongos suplementados, observamos perfis semelhante ao observado com a suplementação com o prebiótico inulina, porém diferente quando observamos células Treg Foxp3+CCR4+, que apesar de estarem aumentadas em porcentagem, estavam reduzidas em número absoluto o que também pode ser indicio de maior migração dessas células para o pâncreas dos animais STZ+BUT. De acordo com (JACOB *et al.*, 2020), a suplementação com butirato é capaz de induzir células Treg nos tecidos linfoides associados ao intestino (GALT) e

migram para os linfonodos pancreáticos e pâncreas atrasando o desenvolvimento do DM1 em camundongos NOD, porém não demonstram um mecanismo exato de como essas células migram para essas regiões. Por fim, analisando linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ nos LP utilizando o marcador CD69⁺ de ativação clássica dessas células (JACOB *et al.*, 2020) importantes para o desenvolvimento das respostas Th1/Th17 e compondo o infiltrado de células nas ilhotas pancreáticas respectivamente (A *et al.*, 2009; BS; RA; DJ, 2006), observamos que os animais STZ+BUT apresentaram redução dessas células em relação aos STZ+H₂O, o que justifica a redução dos níveis de insulite e maior conservação das ilhotas pancreáticas nos camundongos suplementados. Além disso, também observamos que os animais STZ+BUT apresentaram níveis aumentados de células dendríticas tolerogênicas CD103⁺ no LC, que participam da homeostase intestinal de maneira independente das células T (TAKENAKA; QUINTANA, 2016), com aumento significativo do número absoluto de CD103⁺CD11b⁺ que participam da regulação da razão das células Treg/Th17 no intestino (TAKENAKA; QUINTANA, 2016). Esse aumento de células dendríticas tolerogênicas é acompanhado pela tendência de aumento das células Treg CD4⁺Foxp3⁺ e Foxp3⁺CCR4⁺ no LC dos camundongos STZ+BUT em comparação com os STZ+H₂O. Por tanto, nosso estudo evidenciou a eficácia terapêutica do consumo do prebiótico inulina para o controle do DM1, assim como elucidamos seus efeitos na manutenção da camada de muco e indução de tolerância imunológica no intestino e nas ilhotas pancreáticas via microbiota intestinal produzindo butirato a partir da metabolização do prebiótico inulina.

6. CONCLUSÃO

- A suplementação com a inulina conferiu resistência ao desenvolvimento do DM1 em camundongos após STZ;
- A suplementação com inulina induziu a migração de células Treg CD4⁺Foxp3⁺CCR4⁺ via CCL17 para o pâncreas dos animais após administração de STZ;
- A suplementação com inulina reduziu a inflamação intestinal causada durante o desenvolvimento do DM1 associado a manutenção da integridade da barreira intestinal;
- A suplementação com inulina promoveu a prevalência de bactérias probióticas produtoras de acetato e butirato na microbiota intestinal dos animais após STZ;
- A suplementação com a inulina aumentou os níveis de butirato nas fezes dos camundongos
- A suplementação com butirato também conferiu resistência ao desenvolvimento do DM1 em camundongos após STZ
- A suplementação com butirato diminuiu células CD4⁺ e CD8⁺ patogênicas nos LP
- A suplementação com butirato favoreceu o aumento de células dendríticas tolerogênicas CD103⁺CD11b⁺ no LC

REFERENCIAS

A, Willcox *et al.* Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clinical and experimental immunology**, [s. l.], v. 155, n. 2, p. 173–181, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2008.03860.X>. Acesso em: 4 ago. 2021.

ALARD, Jeanne *et al.* Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 1484–1497, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13181>. Acesso em: 27 jun. 2021.

ALYANAKIAN, Marie-Alexandra *et al.* Transforming growth factor-beta and natural killer T-cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 179–185, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16380491>

ANAYA, Juan Manuel *et al.* **The autoimmune ecology**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00139>. Acesso em: 16 maio 2021.

ANDOH, Akira; TSUJIKAWA, Tomoyuki; FUJIYAMA, Yoshihide. Role of Dietary Fiber and Short-Chain Fatty Acids in the Colon. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 347–358, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612033391973>. Acesso em: 29 set. 2020.

ANTONI, Lena *et al.* Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1165–1179, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1165>. Acesso em: 30 maio 2021.

ARANOW, Cynthia. Vitamin D and the immune system. *In:* , 2011. **Journal of Investigative Medicine**. [S. l.]: BMJ Publishing Group, 2011. p. 881–886. Disponível em: <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31821b8755>. Acesso em: 23 maio 2021.

ARIF, Sefina *et al.* Blood and islet phenotypes indicate immunological heterogeneity in type 1 diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 63, n. 11, p. 3835–3845, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db14-0365>. Acesso em: 24 maio 2021.

ARPAIA, Nicholas *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, [s. l.], v. 504, n. 7480, p. 451–455, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature12726>. Acesso em: 18 out. 2020.

ARRIETA, M. C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, Jon B. **Alterations in intestinal permeability**. [S. l.]: Gut, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gut.2005.085373>. Acesso em: 30 maio 2021.

ATKINSON, Mark A.; EISENBARTH, George S. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. *In:* , 2001. **Lancet**. [S. l.]: Elsevier Limited, 2001. p. 221–229. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05415-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05415-0)

BARBEAU, William E.; BASSAGANYA-RIERA, Josep; HONTECILLAS, Raquel. Putting the pieces of the puzzle together - a series of hypotheses on the etiology and pathogenesis of type 1 diabetes. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 607–619, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.07.052>

BARCENILLA, Adela *et al.* Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 1654–1661, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1654-1661.2000>. Acesso em: 28 jun. 2021.

BARERA, Graziano *et al.* Occurrence of celiac disease after onset of type 1 diabetes: A 6-year prospective longitudinal study. **Pediatrics**, [s. l.], v. 109, n. 5, p. 833–838, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1542/peds.109.5.833>. Acesso em: 16 maio 2021.

BELZER, Clara; DE VOS, Willem M. Microbes inside from diversity to function: The case of Akkermansia. **ISME Journal**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1449–1458, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.6>. Acesso em: 27 jun. 2021.

BENOIST, Christophe; MATHIS, Diane. Treg cells, life history, and diversity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 4, n. 9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007021>. Acesso em: 23 maio 2021.

BLOEMEN, Johanne G. *et al.* Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 657–661, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.05.011>. Acesso em: 31 maio 2021.

BONELLI, Michael *et al.* Phenotypic and Functional Analysis of CD4 + CD25 – Foxp3 + T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus . **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 182, n. 3, p. 1689–1695, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1689>. Acesso em: 24 maio 2021.

BONIFACIO, Ezio *et al.* Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 525–52532, 1999.

BRUGMAN, S. *et al.* Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? **Diabetologia**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 2105–2108, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0334-0>. Acesso em: 15 out. 2020.

BRUSKO, Todd *et al.* No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 604–612, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db06-1248>. Acesso em: 30 maio 2021.

BS, McKenzie; RA, Kastelein; DJ, Cua. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. **Trends in immunology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 17–23, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IT.2005.10.003>. Acesso em: 4 ago. 2021.

BURRACK, Adam L.; MARTINOV, Tijana; FIFE, Brian T. **T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00343>. Acesso em: 23 maio 2021.

CANFORA, Emanuel E.; JOCKEN, Johan W.; BLAAK, Ellen E. **Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128>. Acesso em: 31 maio 2021.

CANI, P. D. *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, [s. l.], v. 58, n. 8, p. 1091–1103, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886>. Acesso em: 18 out. 2020.

CANI, P. D. *et al.* Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-

fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 2374–2383, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0>. Acesso em: 18 out. 2020.

CARDWELL, C. R. *et al.* Diabetes care provision and glycaemic control in Northern Ireland: A UK regional audit. **Archives of Disease in Childhood**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 468–473, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/adc.2004.061150>. Acesso em: 16 maio 2021.

CHAN, Clement *et al.* Oligofructose as an adjunct in treatment of diabetes in NOD mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep37627>. Acesso em: 14 out. 2020.

CLARK, Allison; MACH, Núria. **Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: A systematic review for athletes**. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12970-016-0155-6>. Acesso em: 16 maio 2021.

COPPIETERS, Ken T. *et al.* Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 209, n. 1, p. 51–60, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20111187>. Acesso em: 16 maio 2021.

COSTA, Frederico R.C. *et al.* Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activation and contributes to T1D onset. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 213, n. 7, p. 1223–1239, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20150744>. Acesso em: 18 out. 2020.

COX, Maureen A.; HARRINGTON, Laurie E.; ZAJAC, Allan J. **Cytokines and the inception of CD8 T cell responses**. [S. l.]: Trends Immunol, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.004>. Acesso em: 30 maio 2021.

CROTTY, Shane. Follicular Helper CD4 T cells (T_{FH}). **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 29, p. 621–663, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>. Acesso em: 30 maio 2021.

DAVID, Lawrence A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, [s. l.], v. 505, n. 7484, p. 559–563, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/nature12820>. Acesso em: 30 maio 2021.

DE GOFFAU, Marcus C. *et al.* Fecal microbiota composition differs between children with β -cell autoimmunity and those without. **Diabetes**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 1238–1244, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db12-0526>. Acesso em: 15 out. 2020.

DE MORENO DE LEBLANC, Alejandra *et al.* Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity. **BMC Immunology**, [s. l.], v. 9, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-27>. Acesso em: 27 jun. 2021.

DERRIEN, Muriel; BELZER, Clara; DE VOS, Willem M. **Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions**. [S. l.]: Academic Press, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.005>. Acesso em: 27 jun. 2021.

DUFRANE, Denis *et al.* Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): Role of GLUT2 transporter and β -cell plasticity. **Transplantation**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 36–45, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000189712.74495.82>. Acesso em: 23 maio 2021.

EISENBARTH, G S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 314, n. 21, p. 1360–1368, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM198605223142106>. Acesso em: 16 maio 2021.

ERLICH, Henry *et al.* HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 1084–1092, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db07-1331>. Acesso em: 16 maio 2021.

EVERARD, Amandine *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 110, n. 22, p. 9066–9071, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>. Acesso em: 27 jun. 2021.

FARHADI, Ashkan *et al.* **Intestinal barrier: An interface between health and**

disease. [S. l.]: Blackwell Publishing, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03032.x>. Acesso em: 30 maio 2021.

FELLOWS, Rachel *et al.* Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02651-5>. Acesso em: 16 nov. 2020.

FERNANDES, J. *et al.* Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. **Nutrition and Diabetes**, [s. l.], v. 4, n. JUNE, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nutd.2014.23>. Acesso em: 27 jun. 2021.

FERREIRA, Ricardo C. *et al.* IL-21 production by CD4⁺ effector T cells and frequency of circulating follicular helper T cells are increased in type 1 diabetes patients. **Diabetologia**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 781–790, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3509-8>. Acesso em: 24 maio 2021.

FIGUEIREDO, Ana Sofia; SCHUMACHER, Anne. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. **Immunology**, [s. l.], v. 148, n. 1, p. 13–21, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imm.12595>. Acesso em: 30 maio 2021.

FLOESS, Stefan *et al.* Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 0169–0178, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050038>. Acesso em: 24 maio 2021.

FOROUHI, Nita G.; UNWIN, Nigel. **Global diet and health: old questions, fresh evidence, and new horizons.** [S. l.]: Lancet Publishing Group, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30500-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30500-8)

FRANÇOZO, Marcela C.S. *et al.* Dendritic cells and regulatory T cells expressing CCR4 provide resistance to coxsackievirus B5-induced pancreatitis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51311-9>. Acesso em: 15 jun. 2021.

GIBSON, Glenn R. *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 259–275, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/nrr200479>. Acesso em: 31 maio 2021.

GILLESPIE, Kathleen M. *et al.* The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. **Lancet**, [s. l.], v. 364, n. 9446, p. 1699–1700, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17357-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17357-1). Acesso em: 16 maio 2021.

GREEN, A.; PATTERSON, C. C. Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. **Diabetologia**, [s. l.], v. 44, n. SUPPL. 3, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/pl00002950>. Acesso em: 16 maio 2021.

HADIS, Usriansyah *et al.* Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. **Immunity**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 237–246, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.016>. Acesso em: 23 maio 2021.

HAGHIKIA, Aiden *et al.* Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. **Immunity**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 817–829, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.09.007>

HEROLD, Kevan C. *et al.* Diabetes induced with low doses of streptozotocin is mediated by V β 8.2+ T-cells. **Diabetes**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 354–359, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diab.44.3.354>. Acesso em: 23 maio 2021.

HILLS, Ronald D. *et al.* Gut microbiome: Profound implications for diet and disease. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11071613>. Acesso em: 30 maio 2021.

HO, Josephine *et al.* Effect of Prebiotic on Microbiota, Intestinal Permeability, and Glycemic Control in Children With Type 1 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 104, n. 10, p. 4427–4440, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00481>. Acesso em: 14 out. 2020.

HOBER, Didier; SAUTER, Pierre. **Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: Interplay between enterovirus and host**. [S. l.]: Nat Rev Endocrinol, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.27>. Acesso em: 16 maio 2021.

HOENTJEN, Frank *et al.* Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. **Inflammatory Bowel Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 977–985, 2005. Disponível em:

<https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000183421.02316.d5>. Acesso em: 30 maio 2021.

HORI, Shohei; NOMURA, Takashi; SAKAGUCHI, Shimon. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Journal of Immunology**, [s. l.], v. 198, n. 3, p. 981–985, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1079490>. Acesso em: 27 jun. 2021.

HORWITZ, Marc S. *et al.* Presented antigen from damaged pancreatic β cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 79–87, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci11198>

HUBER, Sally; RAMSINGH, Arlene I. **Coxsackievirus-induced pancreatitis**. [S. l.]: Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA , 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vim.2004.17.358>. Acesso em: 15 jun. 2021.

INSEL, Richard A. *et al.* Staging presymptomatic type 1 diabetes: A scientific statement of jdrf, the endocrine society, and the American diabetes association. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1964–1974, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc15-1419>. Acesso em: 16 maio 2021.

IVANOV, Ivaylo I. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, [s. l.], v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>. Acesso em: 30 maio 2021.

JACOB, Neenu *et al.* Butyrate induced Tregs are capable of migration from the GALT to the pancreas to restore immunological tolerance during type-1 diabetes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41598-020-76109-Y>. Acesso em: 4 ago. 2021.

K, Mahnke *et al.* Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. **Blood**, [s. l.], v. 101, n. 12, p. 4862–4869, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-10-3229>. Acesso em: 4 ago. 2021.

KANAGAWA, Osami *et al.* Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: An I-Ag7-dependent reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 4, p. 1721–1724, 1998. Disponível em:

<https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1721>. Acesso em: 23 maio 2021.

KARVONEN, Marjatta. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. **Diabetic Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 857–866, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01925.x>. Acesso em: 16 maio 2021.

KIKUTANI, Hitoshi; MAKINO, Susumu. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Advances in Immunology**, [s. l.], v. 51, p. 285–322, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60490-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60490-3). Acesso em: 23 maio 2021.

KIM, Chang H. *et al.* Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 193, n. 12, p. 1373–1381, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.193.12.1373>. Acesso em: 30 maio 2021.

KIM, Y. A.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. **Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity**. [S. l.]: Cambridge University Press, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S095442241700018X>. Acesso em: 18 out. 2020.

KING, Cecile; SARVETNICK, Nora. The incidence of type-1 diabetes in NOD mice is modulated by restricted flora not germ-free conditions. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. e17049, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017049>. Acesso em: 30 maio 2021.

KOH, Ara *et al.* **From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites**. [S. l.]: Cell Press, 2016a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>. Acesso em: 31 maio 2021.

KOH, Ara *et al.* **From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites**. [S. l.]: Cell Press, 2016b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>. Acesso em: 29 set. 2020.

KUKREJA, Anjali *et al.* Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 131–140, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci13605>. Acesso em: 30 maio 2021.

KYVIK, Kirsten O.; GREEN, Anders; BECK-NIELSEN, Henning. Concordance rates

of insulin dependent diabetes mellitus: A population based study of young Danish twins. **BMJ**, [s. l.], v. 311, n. 7010, p. 913, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.311.7010.913>. Acesso em: 16 maio 2021.

LEY, Ruth E. *et al.* Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, [s. l.], v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/4441022a>. Acesso em: 27 jun. 2021.

LINTERMAN, Michelle A. *et al.* Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 975–982, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.2425>. Acesso em: 23 maio 2021.

LUISSINT, Anny Claude; PARKOS, Charles A.; NUSRAT, Asma. **Inflammation and the Intestinal Barrier: Leukocyte–Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling, and Mucosal Repair**. [S. l.]: W.B. Saunders, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.07.008>. Acesso em: 30 maio 2021.

MACIA, Laurence *et al.* Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. **Nature Communications**, [s. l.], v. 6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms7734>. Acesso em: 27 jun. 2021.

MAKINO, S. *et al.* Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Experimental Animals**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 1–13, 1980. Disponível em: https://doi.org/10.1538/expanim1978.29.1_1. Acesso em: 23 maio 2021.

MANNERING, Stuart I. *et al.* The insulin A-chain epitope recognized by human T cells is posttranslationally modified. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 202, n. 9, p. 1191–1197, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20051251>. Acesso em: 24 maio 2021.

MENZEL, Philip *et al.* The use of amino acid analyses in (palaeo-) limnological investigations: A comparative study of four Indian lakes in different climate regimes. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [s. l.], v. 160, p. 25–37, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.03.028>

MOENS, F.; DE VUYST, L. Inulin-type fructan degradation capacity of clostridium cluster IV and XIVa butyrate- producing colon bacteria and their associated metabolic

outcomes. **Beneficial Microbes**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 473–490, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2016.0142>

MORDES, John P. *et al.* **Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity.** [S. l.]: ILAR J, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ilar.45.3.278>. Acesso em: 30 maio 2021.

MUEGGE, Brian D *et al.* Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 332, n. 6032, p. 970–974, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1198719>

MÜLLER-GRAFF, Franz-Tassilo *et al.* Impact of hyperglycemia on autoimmune pancreatitis and regulatory T-cells. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 24, n. 28, p. 3120–3129, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i28.3120>. Acesso em: 14 out. 2020.

NEPOM, Gerald T. **Conversations with GAD.** [S. l.]: Academic Press, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0896-8411\(03\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0896-8411(03)00031-3). Acesso em: 24 maio 2021.

PARADA VENEGAS, Daniela *et al.* Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. MAR, p. 277, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00277>. Acesso em: 14 jul. 2021.

PARK, Min Jung *et al.* A distinct tolerogenic subset of splenic IDO+CD11b+ dendritic cells from orally tolerized mice is responsible for induction of systemic immune tolerance and suppression of collagen-induced arthritis. **Cellular Immunology**, [s. l.], v. 278, n. 1–2, p. 45–54, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.06.009>. Acesso em: 27 jun. 2021.

PATTERSON, Chris *et al.* Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 161–175, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.005>

PATTERSON, Christopher C. *et al.* Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective

registration study. **The Lancet**, [s. l.], v. 373, n. 9680, p. 2027–2033, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60568-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60568-7). Acesso em: 16 maio 2021.

PECK, Ariana; MELLINS, Elizabeth D. **Plasticity of T-cell phenotype and function: The T helper type 17 example**. [S. l.]: Wiley-Blackwell, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03189.x>. Acesso em: 24 maio 2021.

POLANSKY, Julia K. *et al.* Methylation matters: Binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 88, n. 10, p. 1029–1040, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0642-1>. Acesso em: 24 maio 2021.

PUGLIESE, Alberto. **Autoreactive T cells in type 1 diabetes**. [S. l.]: American Society for Clinical Investigation, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI94549>. Acesso em: 24 maio 2021.

PUTNAM, Amy L. *et al.* Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 652–662, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db08-1168>. Acesso em: 30 maio 2021.

QIN, Hui Yu; SINGH, Bhagirath. BCG vaccination prevents insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice after disease acceleration with cyclophosphamide. *In:* , 1997. **Journal of Autoimmunity**. [S. l.]: Academic Press, 1997. p. 271–278. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jaut.1997.0136>. Acesso em: 30 maio 2021.

RIVIÈRE, Audrey *et al.* **Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut**. [S. l.]: Frontiers Research Foundation, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>. Acesso em: 28 jun. 2021.

ROBERFROID, Marcel B. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. *In:* , 2007. **Journal of Nutrition**. [S. l.]: American Society for Nutrition, 2007. p. 2493–2502. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2493s>. Acesso em: 31 maio 2021.

ROOK, Graham A W; RAISON, Charles L; LOWRY, Christopher A. Can we vaccinate against depression? **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 451–458, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.018>. Acesso em: 16 maio 2021.

ROSENBAUER, J. *et al.* Temporal, seasonal, and geographical incidence patterns of Type I diabetes mellitus in children under 5 years of age in Germany. **Diabetologia**, [s. l.], v. 42, n. 9, p. 1055–1059, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s001250051270>. Acesso em: 16 maio 2021.

RUBTSOV, Yuri P. *et al.* Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. **Science**, [s. l.], v. 329, n. 5999, p. 1667–1671, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1191996>. Acesso em: 23 maio 2021.

SAÏ, P; RIVEREAU, A S. Prevention of diabetes in the nonobese diabetic mouse by oral immunological treatments. Comparative efficiency of human insulin and two bacterial antigens, lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*. **Diabetes & metabolism**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 341–348, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896996>

SAKAGUCHI, Shimon. **Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses**. [S. l.]: Annu Rev Immunol, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>. Acesso em: 23 maio 2021.

SALMINEN, S. *et al.* Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 80, n. S1, p. S147–S171, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1079/bjn19980108>. Acesso em: 31 maio 2021.

SANTOS, Paula Victória Félix dos *et al.* Family income per capita, age, and smoking status are predictors of low fiber intake in residents of São Paulo, Brazil. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 478–487, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.12.011>. Acesso em: 30 maio 2021.

SARDINHA, Aline Nascimento *et al.* Dietary sources of fiber intake in Brazil. **Appetite**, [s. l.], v. 79, p. 134–138, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.04.018>. Acesso em: 30 maio 2021.

SCHMIDT, Angelika; OBERLE, Nina; KRAMMER, Peter H. **Molecular mechanisms of Treg-mediated cell suppression**. [S. l.]: Frontiers Media SA, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00051>. Acesso em: 23 maio 2021.

SCOTT, K. P.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. **Dietary fibre and the gut microbiota**.

[S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2008.00706.x>. Acesso em: 28 jun. 2021.

SGOUROUDIS, Evridiki; PICCIRILLO, Ciriaco A. **Control of type 1 diabetes by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: Lessons from mouse models and implications for human disease.** [S. l.]: Diabetes Metab Res Rev, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dmrr.945>. Acesso em: 23 maio 2021.

SHIVAJI, S. **We are not alone: A case for the human microbiome in extra intestinal diseases.** [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0163-3>. Acesso em: 30 maio 2021.

SHODA, Lisl K.M. *et al.* **A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation.** [S. l.]: Immunity, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.002>. Acesso em: 23 maio 2021.

SINGH, Bhagirath; RABINOVITCH, Alex. Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. **Autoimmunity**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 209–213, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/08916939309019929>. Acesso em: 23 maio 2021.

SONNENBURG, Erica D *et al.* Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. **Nature**, [s. l.], v. 529, n. 7585, p. 212–215, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature16504>

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, [s. l.], v. 299, n. 6710, p. 1259–1260, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6710.1259>. Acesso em: 16 maio 2021.

SUFFIA, Isabelle J. *et al.* Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 203, n. 3, p. 777–788, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20052056>. Acesso em: 23 maio 2021.

TAKENAKA, Maisa C.; QUINTANA, Francisco J. Tolerogenic dendritic cells. **Seminars in Immunopathology 2016 39:2**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 113–120, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00281-016-0587-8>. Acesso em: 4 ago. 2021.

TAKIISHI, Tatiana *et al.* **Vitamin D and diabetes.** [S. l.]: Endocrinol Metab Clin North Am, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.02.013>. Acesso em: 16 maio 2021.

TANG, Qizhi *et al.* Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction. **Immunity**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 687–697, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.016>. Acesso em: 23 maio 2021.

TAP, Julien *et al.* Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. **Environmental microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 4954–4964, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13006>

THAISS, Christoph A. **Microbiome dynamics in obesity.** [S. l.]: American Association for the Advancement of Science, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aav6870>. Acesso em: 16 maio 2021.

THORBURN, Alison N.; MACIA, Laurence; MACKAY, Charles R. Diet, Metabolites, and “Western-Lifestyle” Inflammatory Diseases. **Immunity**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 833–842, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2014.05.014>

TIAN, Yuhua *et al.* MicroRNA-31 Reduces Inflammatory Signaling and Promotes Regeneration in Colon Epithelium, and Delivery of Mimics in Microspheres Reduces Colitis in Mice. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 156, n. 8, p. 2281-2296.e6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.02.023>. Acesso em: 14 jun. 2021.

TODD, John A. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. **Immunology Today**, [s. l.], v. 11, n. C, p. 122–129, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90049-F](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90049-F)

TSAI, Sue; SHAMELI, Afshin; SANTAMARIA, Pere. **Chapter 4 CD8+ T Cells in Type 1 Diabetes.** [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)00804-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)00804-3)

VAARALA, Outi. **Gut microbiota and type 1 diabetes.** [S. l.]: Rev Diabet Stud, 2012a. Disponível em: <https://doi.org/10.1900/RDS.2012.9.251>. Acesso em: 16 maio 2021.

VAARALA, Outi. **Gut microbiota and type 1 diabetes**. [S. l.]: Rev Diabet Stud, 2012b. Disponível em: <https://doi.org/10.1900/RDS.2012.9.251>. Acesso em: 15 out. 2020.

VAN BEKKUM, Herman; RÖPER, Harald; VORAGEN, Fons. **Carbohydrates as Organic Raw Materials III**. [S. l.]: Wiley Blackwell, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527614899>. Acesso em: 31 maio 2021.

VAN BELLE, T. L.; TAYLOR, P.; VON HERRATH, M. G. **Mouse models for Type 1 Diabetes**. [S. l.]: Drug Discov Today Dis Models, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2009.03.008>. Acesso em: 23 maio 2021.

VAN BELLE, Tom L.; COPPIETERS, Ken T.; VON HERRATH, Matthias G. **Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies**. [S. l.]: Physiol Rev, 2011a. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2010>. Acesso em: 16 maio 2021.

VAN BELLE, Tom L.; COPPIETERS, Ken T.; VON HERRATH, Matthias G. **Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies**. [S. l.]: Physiol Rev, 2011b. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2010>. Acesso em: 17 maio 2021.

VAN BELLE, Tom L.; COPPIETERS, Ken T.; VON HERRATH, Matthias G. **Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies**. [S. l.]: Physiol Rev, 2011c. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2010>. Acesso em: 23 maio 2021.

VAN LUMMEL, Menno *et al.* Posttranslational modification of HLA-DQ binding islet autoantigens in type 1 diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 237–247, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db12-1214>. Acesso em: 24 maio 2021.

VIDELA, Sebastián *et al.* Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. **American Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. 1486–1493, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(01\)02365-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(01)02365-6)

VON BOEHMER, Harald; SARUKHAN, Adelaide. **GAD, a single autoantigen for diabetes**. [S. l.]: Science, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1135>. Acesso em: 23 maio 2021.

WANG, Qi *et al.* Akkermansia muciniphila May Determine Chondroitin Sulfate Ameliorating or Aggravating Osteoarthritis. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. OCT, p. 1955, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01955>. Acesso em: 27 jun. 2021.

WEGMANN, Dale R.; EISENBARTH, George S. **It's insulin**. [S. l.]: Academic Press, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0444>. Acesso em: 23 maio 2021.

WEI, Datsen G. *et al.* Mechanisms imposing the V β bias of V α 14 natural killer T cells and consequences for microbial glycolipid recognition. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 203, n. 5, p. 1197–1207, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20060418>. Acesso em: 23 maio 2021.

WESTERHOLM-ORMIO, Mia *et al.* Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 2287–2295, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.9.2287>

WHO | DIET, NUTRITION AND THE PREVENTION OF CHRONIC DISEASES. **WHO**, [s. l.], 2003.

WICHIENTHOT, S.; THAMMARUTWASIK, P.; JONGJAREONRAK, A.; CHANSUWAN, W.; HMADLU, P.; HONGPATTARAKERE, T.; ITHARAT, A.; OORAIKUL, B. **Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand – DOAJ**. [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doaj.org/article/d2aee12247744b9197eb50be1451afad>. Acesso em: 31 maio 2021.

WICKER, Linda S.; TODD, John A.; PETERSON, Laurence B. **Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse**. [S. l.]: Annual Reviews Inc., 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001143>. Acesso em: 23 maio 2021.

WILSON, K. H.; PERINI, F. Role of competition for nutrients in suppression of Clostridium difficile by the colonic microflora. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 2610–2614, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.56.10.2610-2614.1988>. Acesso em: 27 jun. 2021.

WOOD, Steven C.; RAO, T. Dharma; FREY, Alan B. Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. **Cellular Immunology**, [s. l.], v. 192, n. 1, p. 1–12, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1413>. Acesso em: 23 maio 2021.

WU, Gary D. *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, [s. l.], v. 334, n. 6052, p. 105–108, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1208344>. Acesso em: 30 maio 2021.

YUAN, Qian *et al.* CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 204, n. 6, p. 1327, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/JEM.20062076>. Acesso em: 23 ago. 2021.

ZHANG, Lihong *et al.* Improvement of oxazolone-induced ulcerative colitis in rats using andrographolide. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25010076>. Acesso em: 14 jun. 2021.

ZHANG, Shu *et al.* HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 24–38, 2010.

ZHOU, Liang; CHONG, Mark M.W.; LITTMAN, Dan R. **Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation**. [S. l.]: Immunity, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>. Acesso em: 24 maio 2021.

ZIEGLER, Steven F. FOXP3: Not just for regulatory T cells anymore. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 21–23, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.200636929>. Acesso em: 24 maio 2021.

ZMORA, Niv; SUEZ, Jotham; ELINAV, Eran. **You are what you eat: diet, health and the gut microbiota**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>

ZOU, Jun *et al.* Fiber-Mediated Nourishment of Gut Microbiota Protects against Diet-Induced Obesity by Restoring IL-22-Mediated Colonic Health. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 41-53.e4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.003>. Acesso em: 27 jun. 2021.

ZOU, Jun *et al.* Inulin Fermentable Fiber Ameliorates Type I Diabetes via IL22 and Short-Chain Fatty Acids in Experimental Models. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 0, n. 0, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.04.014>. Acesso em: 15 jun. 2021.