

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Nathalia dos Santos Magalhães

Papel do TLR4 na hiperatividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal em indivíduos diabéticos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular com ênfase em Imunofarmacologia

Orientador: Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

RIO DE JANEIRO

2018

Magalhães, Nathalia .

Papel do TLR4 na hiperatividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal em indivíduos diabéticos / Nathalia Magalhães. - Rio de Janeiro, 2018.

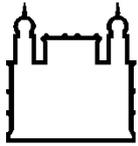
84 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Vinicius Carvalho.

Bibliografia: f. 61-68

1. Diabetes. 2. Hiperatividade do eixo HPA. 3. TLR4. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Nathalia dos Santos Magalhães

**PAPEL DO TLR4 NA HIPERATIVIDADE DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-
ADRENAL EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS**

ORIENTADOR: Vinicius Frias de Carvalho

Aprovada em: 30/07/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. - Adriana Ribeiro Silva- Presidente

Prof. Dr^a. Ana Rosa Perez

Prof. Dr^a. Karen de Jesus Oliveira

Prof. Dr^a. Hugo Caire de Castro Faria Neto (Suplente)

Prof. Dr^a. Vanessa Estato de Freitas Almeida (Suplente)

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2018

Aos meus amados pais.

AGRADECIMENTO

Gostaria, primeiramente, de agradecer a Deus por todas as conquistas que obtive ao longo da minha vida, pois sem Ele ao meu lado nada poderia ter sido conquistado.

Também agradeço aos meus pais, Roberto e Simone, por todos os esforços que fizeram por mim tendo, por vezes, deixado de realizar sonhos próprios para investir nos meus, por todo amor e apoio que me deram ao longo de toda a minha vida. A minha irmã, Juliana, que foi a minha primeira grande amiga e que fez parte, de alguma maneira, de todas as conquistas obtidas tanto no âmbito profissional, quanto emocional.

Ao meu noivo e futuro marido, Marcelo Duque Estrada, por todo o carinho que teve comigo nos momentos mais cruciais da minha carreira e que esteve ao meu lado me apoiando em todas as decisões que tomei.

Aos amigos de faculdade de adquirir durante a minha vida acadêmica e fizeram parte do meu aprendizado. Assim como os amigos que cultivei por toda a vida e que fizeram mais leve os momentos de pressão que tive na faculdade.

Aos excelentes docentes da BCM que foram pilares para o conhecimento até aqui adquiridos, ensinando com amor e dedicação.

Ao meu orientador Vinicius de Frias Carvalho por toda paciência e ensinamentos que por ele me foram oferecidos.

A todo o laboratório de inflamação, em especial Daniella Insuela, Jessika Prevatto e Tassia Santoro, que sempre fizeram um ambiente mais agradável para realização da pesquisa, aqui apresentada.

E por fim, gostaria de agradecer as agências de fomento Cnpq e Faperj, e a própria FIOCRUZ pelo apoio financeiro que ajudaram a desenvolver esse projeto aqui apresentado.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

ILUSTRAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1.1 Mapa ilustrando a incidência de casos de diabetes no mundo, além de fazer uma estimativa do número de casos para 2045.....	5
Figura 1.2 Comorbidades associadas à fisiopatologia da Diabetes.....	6
Figura 1.3 Imagem esquemática descrevendo a regulação do eixo HPA.....	8
Figura 1.4 Vias de sinalização de TLR4.....	13
Figura 5.1.1 Animais diabéticos apresentam aumento na expressão de TLR4 tanto na hipófise quanto na adrenal.....	28
Figura 5.2.1 Efeito de Rosiglitazona sob a expressão de TLR4 na hipófise de animais diabéticos.....	30
Figura 5.2.2 Efeito de Rosiglitazona sob a expressão de TLR4 na adrenal de animais diabéticos.....	31
Figura 5.3.1 Nível glicêmico e peso corporal de camundongos mutantes para TLR4 diabéticos.....	34
Figura 5.3.2 Nível plasmático de insulina de camundongos mutantes para TLR4 diabéticos.....	35
Figura 5.3.3 Nível plasmático de corticosterona de camundongos mutantes para TLR4 diabéticos.....	36
Figura 5.3.4 Camundongos diabéticos mutantes para TLR4 não apresentam hipertrofia da adrenal.....	37
Figura 5.3.5 Efeito do antagonista de TLR4 (TAK-242) sobre o nível glicêmico e peso corporal de camundongos diabéticos.....	38
Figura 5.3.6 Efeito do antagonista de TLR4 (TAK-242) sobre a insulina plasmática de camundongos diabéticos.....	39
Figura 5.3.7 Efeito do antagonista de TLR4 (TAK-242) sobre o corticosterona plasmática.....	40
Figura 5.3.8 Efeito do antagonista de TLR4 (TAK-242) sobre hipertrofia da adrenal em camundongos diabéticos.....	41
Figura 5.3.9 Animais diabéticos apresentam aumento na expressão de NFκB na hipófise.....	42
Figura 5.3.10 Ratos Wistar diabéticos apresentam hipertrofia da adrenal.....	43

Figura 5.3.11 Ratos Wistar diabéticos apresentam hipercorticoidismo acentuado quando submetidos ao LPS.....	44
Figura 5.4.1 Quantificação plasmática de ácidos graxos não-esterificado de animais diabéticos.....	45
Figura 5.5.1 Efeito do coquetel de antibiótico sobre o nível glicêmico e peso corporal de camundongos diabéticos.....	47
Figura 5.5.2 Efeito do coquetel de antibiótico sobre a insulina plasmático de insulina de camundongos diabéticos.....	48
Figura 5.5.3 Efeito do coquetel de antibiótico sobre o nível plasmático de corticosterona e peso da adrenal de camundongos diabéticos.....	49
Figura 5.5.4 Efeito do coquetel de antibiótico sobre a permeabilidade intestinal de camundongos diabéticos.....	50
Figura 7.1 Imagem esquemática das alterações encontradas em indivíduos diabéticos.....	60

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Diabetes induz o quadro de hiperglicemia, hipoinsulinemia, perda peso corporal e hipercorticooidismo em ratos Wistar.....	27
--	----

LISTA DE EQUAÇÃO

<i>Equação 1:</i> Equação que demonstra a fórmula utilizada para avaliar a hipertrofia da adrenal.....	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SLIGAS

11-βHSD1	11β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1
11-βHSD2	11β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AEC	Aminoetilcarbazol
AKT/PKB	Proteína quinase B
ADP	Adenosina diifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CO2	Gás carbônico
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CRHR1	Receptor do hormônio liberador de corticotropina 1
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM 1A	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1A
DM 1B	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 B
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> gestacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M	Erro padrão da média
SFB	Soro fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GALT	Tecido linfático associado ao intestino
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLUT2	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT4	Transportador de glicose do tipo 2
H2	Gás hidrogênio
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HMGB1	Proteína do grupo 1 de mobilidade alta
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HSP60	Proteína de choque térmico 60
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IDF	Federação internacional de Diabetes

IgA	Imunoglobulina A
IL-12	Interleucina 12
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-8	Interleucina 8
IRS	Substrato do receptor de insulina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina do tipo 1
LPS	Lipopolissacarídeo
MC2-R	Receptor de melanocortina tipo 2
MyD88	Molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88
MR	Receptor de mineralocorticóide
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOD	Animal diabético não-obeso
PH	Potencial de hidrogênio
PBS	Salina tamponada com fosfato
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol3-quinase
PI-4,5P2	Fosfatidilinositol-4-5-difosfato
PI-4P	Fosfatidil-inositol-4-fosfato
POMC	Pró-ópio-melanocortina
PPARγ	Receptor ativado por proliferação de peroxissoma γ
RIA	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucleico
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta
SGLT2	Transportador tipo sódio-glicose tipo 2
STAR	Proteína reguladora esteroideogênica aguda
SUS	Sistema Único de saúde
TBST	Salina tamponada com Tris com Tween-20
TLR	Receptor do tipo “toll”
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

RESUMO

A hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) na diabetes é pouco compreendida. Mostramos anteriormente que o aumento da atividade do eixo HPA estava relacionado à regulação negativa do receptor ativado por proliferação de peroxissoma (PPAR) γ nas glândulas hipófise e adrenal de ratos diabéticos. Por outro lado, a relação funcional antagônica entre o PPAR γ e o receptor Toll-like 4 (TLR4) é conhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do TLR4 na hiperatividade do eixo HPA observada em animais diabéticos. A diabetes foi induzido por injeção intravenosa de aloxana em animais em jejum. O agonista do PPAR γ , rosiglitazona, foi administrado diariamente durante 18 dias consecutivos, com início 3 dias após a indução da diabetes. O antagonista de TLR4, TAK-242, e o coquetel de antibióticos (Metronidazol, Ampicilina e Neomecina) foram administrados diariamente por 14 dias consecutivos, começando 7 dias após a indução da diabetes. Nossos dados mostraram que a expressão de TLR4 foi aumentada na hipófise e adrenal de ratos diabéticos em comparação a ratos não-diabéticos. Além disso, a rosiglitazona diminuiu a expressão de TLR4 de animais diabéticos em ambas as glândulas. A fim de compreender a importância do TLR4 na hiperatividade do eixo HPA sob condições diabéticas, usamos camundongos mutantes para sinalização de TLR4 (C3H.HeJ) ou camundongos diabéticos tratados com TAK-242. Ambos os camundongos diabéticos C3H.HeJ e camundongos diabéticos tratados com TAK-242 não apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona em comparação a animais diabéticos não-tratados. Além disso, estimulamos ratos diabéticos com lipopolissacarídeo (LPS) e analisamos os níveis de corticosterona após diferentes tempos. Apesar dos ratos diabéticos não-estimulados apresentarem hipercorticoidismo, o LPS foi capaz de aumentar os níveis de glicocorticóides 1 hora após a estimulação com LPS, no entanto o LPS não aumentou os níveis plasmáticos de glicocorticóides nos animais não-diabéticos neste tempo. Além disso, observamos que ambos os ácidos oléico e esteárico, avaliados por HPLC, estavam aumentados no plasma de ratos diabéticos em comparação com ratos não diabéticos. Camundongos diabéticos foram tratados com um coquetel de antibióticos para estabelecer um modelo de camundongos *germ free* "like". Camundongos diabéticos aumentaram a permeabilidade intestinal e este processo foi revertido com o tratamento com coquetel antibiótico. O tratamento com antibióticos também diminuiu os níveis plasmáticos de corticosterona em camundongos diabéticos. Em conclusão, nossos achados revelaram que o TLR4 parece ser importante para a hiperatividade do eixo HPA observada em animais diabéticos.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes; Hiperatividade do eixo HPA; TLR4

ABSTRACT

The hyperactivity of hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in diabetes is poorly understood. We previously showed that increased HPA axis activity was related to down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in pituitary and adrenal glands of diabetic rats. On the other hand, the functional antagonistic relationship between PPAR γ and *toll-like* receptor 4 (TLR4) is known. The aim of this work was to evaluate the role of TLR4 in HPA axis hyperactivity noted in diabetic animals. Diabetes was induced by intravenous injection of alloxan into fasted animals. The PPAR γ agonist rosiglitazone was administered daily for 18 consecutive days, starting 3 days after diabetes induction. The TLR4 antagonist TAK-242 and antibiotic cocktail (Metronidazole, Ampicillin and Neomycin) were administered daily for 14 consecutive days, beginning 7 days after diabetes induction. Our data showed that the expression of TLR4 was increased in pituitary and adrenal of diabetic rats compared to non-diabetic rats. Besides that, rosiglitazone decreased TLR4 expression in both glands of diabetic animals. In order to understand the importance of TLR4 in the hyperactivity of HPA axis under diabetic conditions, we used mutant mice for TLR4 signaling (C3H.HeJ) or treated diabetic mice with TAK-242. Both Diabetic C3H.HeJ mice and diabetic mice treated with TAK-242 did not present increased plasma corticosterone levels compared to naïve untreated diabetic animals. We also stimulated diabetic rats with lipopolysaccharide (LPS) and analyzed corticosterone levels after different times. Despite non-stimulated diabetic rats presented hypercorticism, LPS was capable to increase glucocorticoid levels 1 h after LPS stimulation, however LPS did not rise plasma glucocorticoid levels in non-diabetic mice at this time. Furthermore, we observed that both oleic and stearic acids, assessed by HPLC, were increased in plasma of diabetic rats compared to non-diabetic rats. In addition, we treated diabetic mice with a cocktail of antibiotics in order to establish a model of germ free like mice. Diabetic mice increased intestinal permeability and this process was reversed with antibiotic cocktail treatment. Antibiotic cocktail treatment also decreased plasma corticosterone levels in diabetic mice. In conclusion, our findings revealed that TLR4 seems to be important for HPA axis hyperactivity observed in diabetic animals.

KEYWORDS: Diabetes; HPA axis hyperactivity; TLR4

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	iii
ILUSTRAÇÃO DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELA.....	vii
LISTA DE EQUAÇÃO.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SLIGAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Diabetes mellitus</i>	1
1.1.1 Descrição	1
1.1.2 Epidemiologia.....	2
1.1.3 Comorbidades secundárias associadas a DM	6
1.2 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.....	7
1.3 Diabetes x Eixo HPA.....	10
1.4 TLR4.....	11
1.5 Microbiota intestinal	14
1.6 DM x TLR4 x Microbiota.....	15
2 HIPÓTESE.....	17
3 OBJETIVO.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 METODOLOGIA	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Indução da DM	19

4.3	Tratamentos	19
4.3.1	Rosiglitazona	19
4.3.2	Antagonista de TLR4 (TAK-242)	20
4.3.3	Coquetel de antibiótico.....	20
4.4	Estímulo com LPS	20
4.5	Quantificação da glicose sanguínea.....	20
4.6	Quantificação de hormônios circulantes.....	20
4.6.1	Obtenção das amostras	20
4.6.2	Quantificação das amostras	21
4.7	Análise de permeabilidade intestinal	21
4.7.1	Obtenção das amostras	21
4.7.2	Quantificação das amostras	21
4.8	Análise de Hipertrofia das adrenais	22
4.9	Imunohistoquímica	22
4.10	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	23
4.11	Soluções	24
4.11.1	TBS 1X:.....	24
4.11.2	TBS-Tween 20:	24
4.11.3	AEC uso:	24
4.11.4	Meio de montagem (gelatina/glicerina):	24
4.11.5	Millonig:	24
4.12	Drogas utilizadas.....	25
4.13	Análise estatística	25
5	RESULTADOS	26
5.1	Ratos Wistar diabéticos apresentam aumento de TLR4 na hipófise e adrenal	26

5.2	Ativação de PPAR γ reduz a expressão de TLR4 na hipófise e adrenal de animais diabéticos.....	29
5.3	Níveis aumentados de corticosterona observado em animais diabéticos dependem da ativação de TLR4	32
5.4	Animais diabéticos apresentam níveis circulantes de ativadores de TLR4 endógenos aumentados.....	45
5.5	Ativação de TLR4 nas glândulas que compõem o eixo HPA de animais diabéticos pode estar associada com a translocação bacteriana presente na microbiota intestinal	46
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	59
8	BIBLIOGRAFIA	61
9	TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO PERÍODO DO MESTRADO	69
10	ANOTAÇÕES	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Diabetes mellitus*

1.1.1 *Descrição*

Segundo a Associação Americana de Diabetes, existem quatro tipos de DM, sendo eles, DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional (DMG) e outros tipos específicos de DM, como a DM neonatal (1). A DM1 é uma doença autoimune decorrente da destruição de células β pancreáticas, o que leva a diminuição drástica na produção de insulina. Esse tipo de DM atinge por volta de 5 a 10% de todos os casos de DM acometendo em sua maioria crianças e adolescentes (2). A DM1 pode ser subclassificada em DM 1A ou 1B pela presença ou ausência de anticorpos autorreativos, respectivamente. Apesar de trabalhos demonstrarem a associação entre DM1 a uma predisposição genética, sabe-se que fatores ambientais são capazes de desencadear respostas autoimunes como, por exemplo, infecções virais, componentes dietéticos e composição da microbiota intestinal (3). Uma das primeiras manifestações clínicas indicativa para o diagnóstico do paciente com DM1 é a cetoacidose diabética, caracterizada por vômitos, confusão mental, pressão baixa, coma em 10% dos casos e até o óbito. A cetoacidose diabética se dá por falta de percepção da principal fonte de energia pelas células, a glicose, com isso o organismo busca obtenção de energia através de outras vias metabólicas, como a degradação lipídica, que tem como um dos produtos finais os corpos cetônicos (3). Por consequência, por terem um potencial de hidrogênio (pH) ácido levam a acidificação do sangue (4). O principal tratamento para pacientes com DM1 é a insulinoterapia, ou seja, a administração de insulina exógena a fim de compensar a falta de produção deste hormônio (3).

A DM2 é caracterizada pela ineficácia da ação da insulina, isto é, pacientes que desenvolvem DM2 apresentam uma resistência insulínica. Estima-se que a DM2 corresponde de 90-95% dos casos de DM, acometendo adultos e idosos em sua maioria (2). A etiologia da DM2 é complexa e multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais, porém não completamente entendida. Sabe-se que fatores de riscos contribuem para o desenvolvimento dessa doença, como obesidade, sedentarismo, maus hábitos alimentares, histórico familiar, entre outros. Atualmente, os principais tratamentos utilizados para pacientes com DM2 é a melhora dos hábitos alimentares, prática de exercícios físicos, podendo ser associado a fármacos antidiabéticos orais, que tem como objetivo manter níveis normais de glicemia. Os mecanismos dos hipoglicemiantes orais são: i) aumentar a secreção de insulina pancreática

(sulfonilureias e glinidas); ii) reduzir a velocidade de absorção de glicídios (inibidores de α -glicosidases); iii) diminuir a produção hepática de glicose (biguanidas); iv) aumentar a utilização periférica de glicose (glitazonas); v) aumentar a produção ou impedir a degradação de incretinas, cujo papel é aumentar a produção de insulina (gliptinas e análogos/miméticos a GLP-1); vi) inibir a recaptação de glicose nos rins (inibidores da SCLT2) (3).

Por fim, a DMG é classificada quando a paciente desenvolve o quadro de hiperglicemia durante a gravidez, sendo revertida, em sua maioria, após o parto. O aumento dos níveis de glicose na gestação é resultado de hormônios hiperglicemiantes e enzimas degradantes de insulina produzidos pela placenta. Acredita-se que a prevalência de mulheres acometidas pela DMG é entorno de 1 a 14% dependendo da população estudada. Os fatores de risco associados são idade materna avançada, obesidade, ganho excessivo de peso na gravidez, histórico familiar, entre outros. A fisiopatologia da DM gestacional se assemelha muito com a DM2, uma vez que essas mulheres desenvolvem uma resistência insulínica. As medidas terapêuticas são as mesmas recomendadas aos pacientes com DM2 como melhora dos hábitos alimentares, prática de exercícios físicos, uso de hipoglicemiantes orais e podendo ser indicada a insulino terapia.

1.1.2 Epidemiologia

A DM é uma doença crônico-degenerativa que acomete todos os países do mundo, não havendo nenhuma relação socioeconômica estabelecida. Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), estimou-se que, em 2017, havia 425 milhões de pessoas diabéticas em todo o mundo, tendo uma projeção de 629 milhões para 2045 (Figura 1.1). Vale ressaltar que a DM acomete pacientes cada vez mais jovens, sendo estimado que 77% dos casos de DM em todo o mundo atinge pacientes da faixa etária entre 24 a 64 anos. No ranking de países com maior incidência de pacientes diabéticos, o Brasil ocupa o 4º lugar, ficando atrás apenas da China, Índia e Estados Unidos. Estima-se que o Brasil tinha 12,5 milhões de casos de DM em 2017, e que em 2045 haja 21,8 milhões (2).

Segundo a IDF, estima-se que o Brasil gastou cerca de 34 milhões de dólares para o tratamento dos pacientes diabéticos, sendo este gasto insuficiente para que o Brasil ocupasse o ranking top 10 de países que mais investem no tratamento do paciente diabético (2). Em outro estudo recente, demonstrou-se que se gasta muito com a DM no Brasil, seja pela doença em si ou pelas comorbidades que o paciente diabético desenvolve ao longo do tempo. Segundo o trabalho, aponta-se que a hospitalização de um adulto diabético pelo SUS custa cerca de 20%

mais caro do que um paciente que não tenha essa enfermidade. Ao ponto de cerca de 4% de todo o orçamento do SUS ser destinado a DM e suas complicações (5).

Os custos com as comorbidades associadas a DM oneram o Brasil não só de forma direta, como internações e medidas assistenciais, como de forma indireta, ausentando este cidadão de suas funções ocupacionais por comorbidades incapacitantes, por sua vez, onerando a previdência (5).

A DM é uma enfermidade de diversas etiologias, sendo caracterizada por hiperglicemia crônica. A hiperglicemia é decorrente da insuficiência da secreção da insulina ou pela incapacidade de empenhar sua ação acarretando em distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (3, 6). A insulina é produzida pelas células β pancreáticas localizadas, mais especificamente, no pâncreas endócrino. Este hormônio tem como principal função promover a sinalização celular para a entrada de glicose do meio sanguíneo para o interior da célula (7, 8). Vale ressaltar que a glicose circulante pós-absorvida é captada pelos tecidos de duas maneiras i) com o auxílio da insulina em células insulino-dependentes e, ii) sem a necessidade deste hormônio, pelas células insulino-independentes. A absorção da glicose pelos tecidos insulino-independentes ocorre por difusão facilitada com o auxílio de proteínas denominadas transportadores de glicose (GLUTs), cujo principal é o GLUT2, que são expressos constitutivamente na membrana plasmática. A captação da glicose por este mecanismo representa 75% da absorção da glicose circulante (9).

Nos tecidos insulino-dependentes, cujos principais representantes são o tecido muscular esquelético e o tecido adiposo, a ligação entre a insulina e sua célula-alvo gera a autofosforilação do receptor de insulina em resíduos de tirosina, por conseguinte, a fosforilação de diversos substratos proteicos como o substrato do receptor de insulina (IRS). Em seguida, a IRS fosforilada promove sítios de reconhecimento e ligação a moléculas que contem homologia, sendo a mais famosa a enzima fosfatidilinositol3-quinase (PI3K) (7). A união entre IRS fosforilada e PI3K gera a ativação da enzima. Uma vez ativada, a PI3K irá catalisar a fosforilação do fosfatidilinositol-4-5-difosfato (PI-4,5P₂), do fosfatidilinositol (PI) e do fosfatidil-inositol-4-fosfato (PI-4P), o que resulta na estimulação do transporte de glicose. Além disso, algumas proteínas irão ser ativadas pela via de PI3K como, por exemplo, a AKT também chamada de PKB. A proteína AKT têm diversas funções conhecidas como regulação gênica, crescimento celular e estimulação do recrutamento do GLUT4 para a superfície da célula, permitindo o influxo de glicose para o meio intracelular (8). Quando liberada, a insulina regula os níveis circulantes de glicose através da restrição da produção de glicose

pelo fígado e pela maior captação desta pelas células musculares e adiposas, sendo, posteriormente, transformada em reserva energética (10).

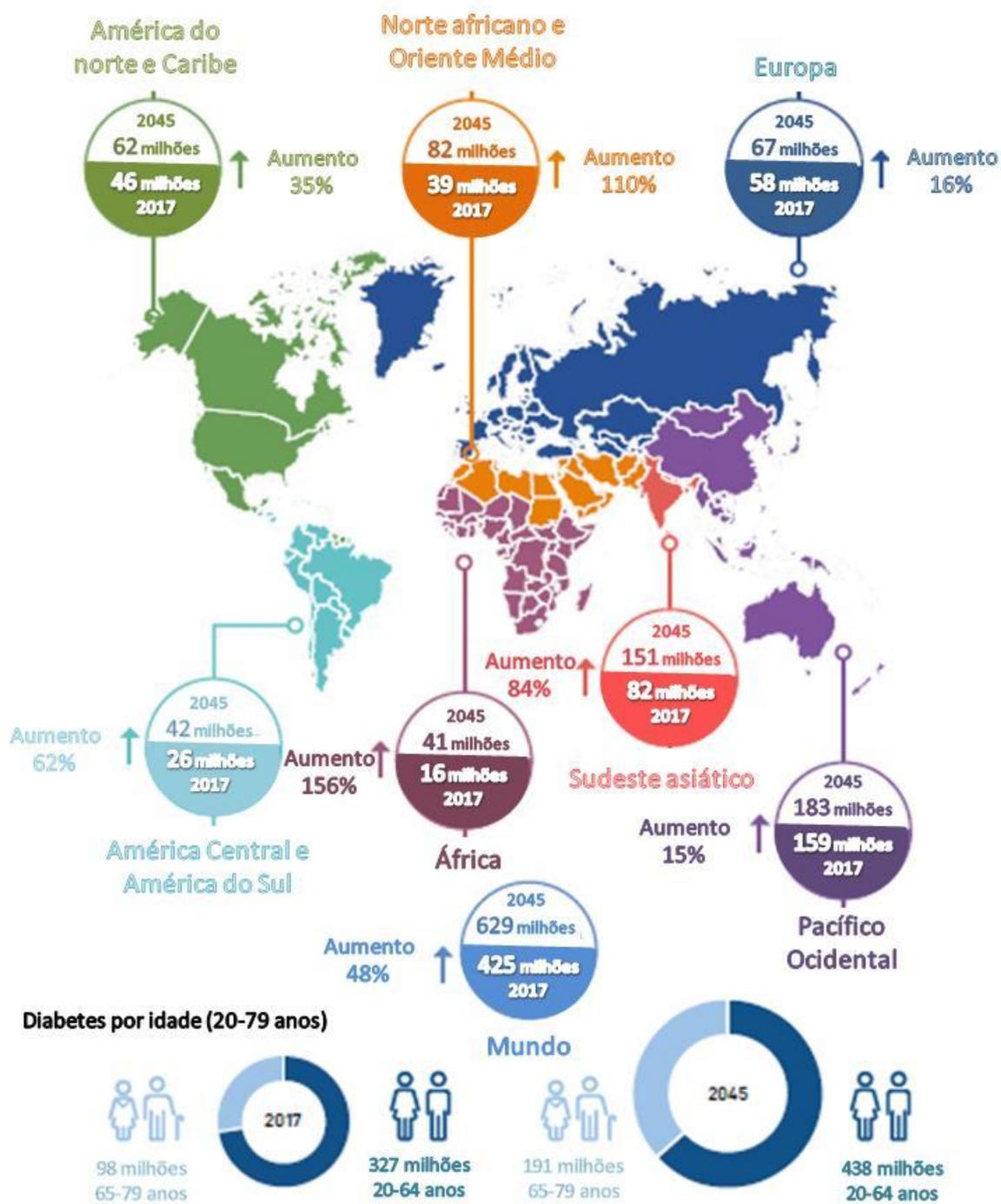


Figura 1.1 Mapa ilustrando a incidência de casos de diabetes no mundo, além de fazer uma estimativa do número de casos para 2045. Fonte: Adaptado IDF, 2017

1.1.3 Comorbidades secundárias associadas a DM

A hiperglicemia crônica leva a diversos malefícios ao paciente diabético, uma vez que essa condição leva a complicações secundárias, incluindo nefropatia, neuropatias, deficiência de cicatrização, doenças cardiovasculares, maior incidência de doenças infecciosas e de depressão, entre outras (Figura 1.2).

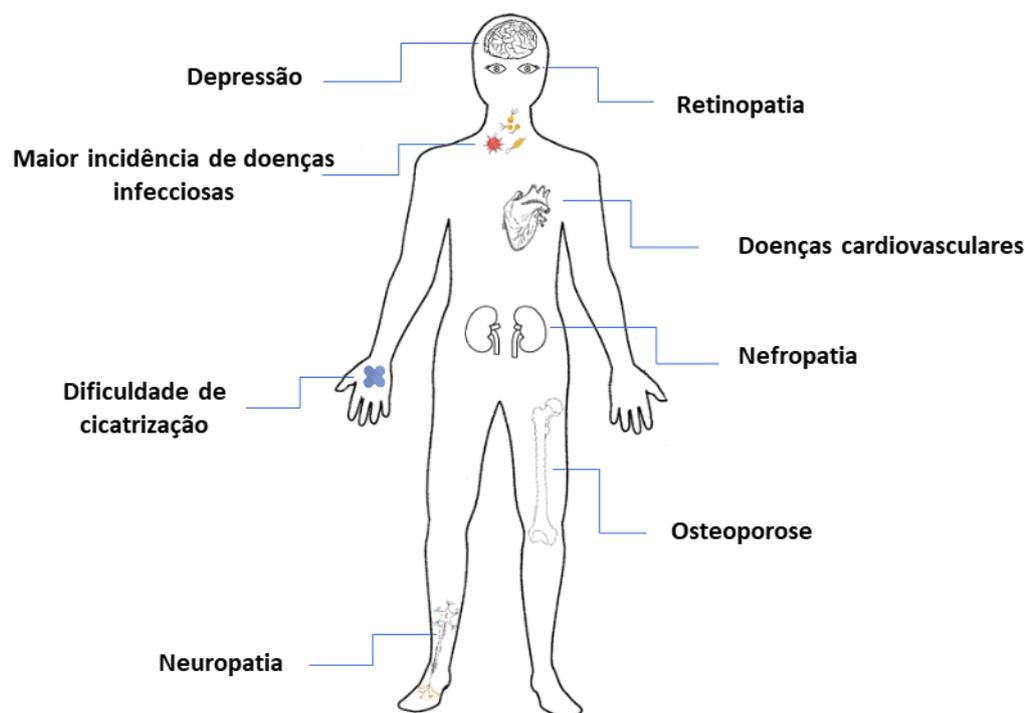


Figura 1.2: Comorbidades associadas à fisiopatologia da DM. Fonte: Adaptado IDF, 2017.

A nefropatia é a comorbidade mais comum e precoce em pacientes diabéticos ocasionada por uma angina nos capilares dos glomérulos renais devido a altas concentrações de glicose no lúmen. Essa situação resulta na não reabsorção de proteínas e gerando alta proteinúria. Quando não tratada, a nefropatia pode evoluir para o quadro de insuficiência renal parcial ou total (11). Outra comorbidade com alta prevalência em pacientes diabéticos com glicemia não controlada é a retinopatia, sendo esta a principal causa de cegueira na população adulta do ocidente. A retinopatia é ocasionada pela deterioração de capilares presentes na retina em consequência a alta concentração de glicose no sangue (12).

Estudos demonstram uma associação entre glicemia não controlada e aumento dos níveis circulantes de glicocorticoide em indivíduos diabéticos (13). Além disso, sabe-se que a recíproca é verdadeira, isto é, pacientes com o uso prolongado de corticoides exógenos levam ao quadro de resistência insulínica e, conseqüentemente, levando a DM (14). O

glicocorticoide é regulado por um eixo neuroendócrino composto pelo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O aumento crônico de glicocorticoide plasmático pode ter diversas etiologias como o uso prolongado de fármacos contendo corticoide, fatores estressores intermitentes como a privação de sono, por fim, tumores nas glândulas que compõem o eixo HPA(15).

1.2 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

O glicocorticoide, cujo principal tipo em humanos é o cortisol e em roedores a corticosterona, é um hormônio esteroidal produzido pelas células corticais da zona fasciculada da glândula adrenal e, é finamente regulado por um eixo neuroendócrino constituído pelo hipotálamo, hipófise (também chamada de pituitária) e adrenal. Em homeostase, o eixo HPA é regulado pelo ciclo circadiano, ou seja, em humanos, o glicocorticoide apresenta seu maior pico de produção na parte da manhã por volta de 8 horas da manhã. Em roedores, o maior pico de produção da corticosterona é durante a noite, por volta das 8 horas da noite (16).

A ativação do eixo HPA se dá através de neurônios do núcleo paraventricular presente no hipotálamo com intuito da liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH). Por sua vez, o CRH alcança a circulação porta hipotálamo-hipofisária e ganha a hipófise anterior, também conhecida como adenohipófise. Com isso, o CRH se liga ao seu receptor CRHR1 e promove a síntese e clivagem do hormônio precursor pró-opio-melanocortina (POMC), cujo um dos seus produtos é o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), sendo este fundamental para o funcionamento e regulação do eixo HPA. Após a liberação de dois hormônios importantes para a ativação do eixo HPA, o CRH e o ACTH, este último irá ganhar a circulação sistêmica. Na glândula adrenal, mais especificamente na porção cortical, o ACTH liga-se em seu receptor MC2R localizado na zona fasciculada e promove a sinalização celular para a produção do glicocorticoide a partir do colesterol (Figura 1.3). A produção do glicocorticoide é realizada após várias reações químicas que serão promovidas, por exemplo, pela proteína reguladora esteroideogênica aguda (StAR) e 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (11 β HSD-1). Por fim, o glicocorticoide é liberado e exerce suas funções no metabolismo (16-18).

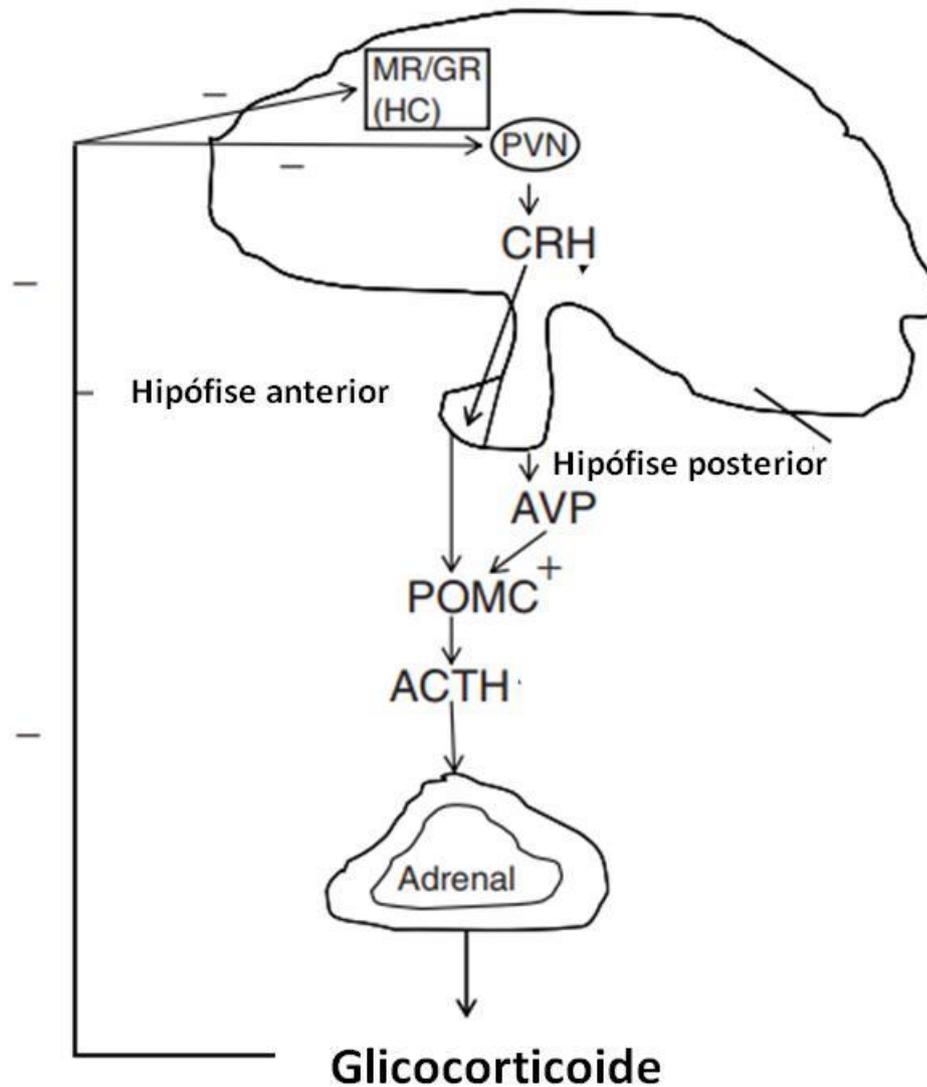


Figura 1.3: Imagem esquemática descrevendo a regulação do eixo HPA. Fonte: Adaptado Compr Physiol. 2014 Oct;4(4):1495-510.

Sabe-se que o glicocorticoide em altas concentrações é prejudicial ao organismo como em pacientes diabético intensifica as comorbidades relacionadas, com isso, o eixo HPA é finamente regulado por um *feedback* negativo (18). Ou seja, o próprio glicocorticoide é capaz de gerar uma sinalização celular para a diminuição de sua síntese e liberação. Isto se dá através da ligação do glicocorticoide ao seu receptor (GR) presente na hipófise e hipotálamo. Outro receptor envolvido no *feedback* negativo do eixo HPA é o receptor de

mineralocorticoide (MR) que apesar de ser caracterizado por ser um receptor de aldosterona, também pode ser ativado, com menor afinidade, pelos glicocorticoides nestas glândulas (18).

O glicocorticoide tem como principal função seu efeito hiperglicemiante, isto é, através de mobilização energética leva ao aumento plasmático de glicose a fim de se obter energia. Com isso, os processos metabólicos nos quais o glicocorticoide atua são muitos, incluindo ação no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. De forma geral, este hormônio leva ao aumento da produção de glicose no fígado, diminuição da produção de insulina e indução de resistência periférica à insulina, lipólise e proteólise, a fim de produzir substrato para produção de glicose (19).

Sabe-se que o glicocorticoide é responsável pela inibição da síntese de proteína através da estimulação de enzimas proteolíticas, além de impedir a captação de aminoácidos pelo tecido muscular. Além disso, o hormônio esteroide leva a lipólise no tecido adiposo (20). Ao final destes processos, o glicocorticoide leva a um aumento de aminoácidos, ácidos graxos não-esterificados e triglicerídeos na corrente sanguínea. Por fim, no fígado há produção de glicose a partir de precursores como lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos, processo denominado gliconeogênese (21, 22).

Na periferia, o glicocorticoide leva a resistência à insulina nos músculos esqueléticos, sendo estes responsáveis por 80% da captação de glicose mediada pela insulina. Os mecanismos envolvidos com essa resistência insulínica são diversos, sendo o principal a diminuição da fosforilação de IRS-1, PI3K e AKT, portanto inibindo o recrutamento do GLUT4 para a membrana plasmática. Outro ponto a ser levantado, é que o aumento de produtos derivados da lipólise e proteólise também interferem na cascata de fosforilação de IRS-1 e PI3K culminando em resistência insulínica (21, 22).

Por fim, nas células β pancreáticas, o glicocorticoide em altas concentrações a longo prazo inibe a secreção de insulina pela diminuição da expressão de GLUT2 e por consequência a captação de glicose, processo fundamental para liberação de insulina. O glicocorticoide também inibe a produção de insulina através da diminuição de ATP/ADP e indução de apoptose das células β pancreáticas de forma direta ou indireta, sendo esta última devido à lipotoxicidade exercida pelos ácidos graxos livres (19, 21, 22).

1.3 Diabetes x Eixo HPA

Apesar de apresentar hipercorticooidismo, animais diabéticos ao receberem uma injeção contendo CRH exógeno aumentaram os níveis circulantes de glicocorticoide, ficando evidente a hiperatividade do eixo HPA nesses animais. Posteriormente, se observou que animais diabéticos apresentavam aumento da expressão de RNA mensageiro para CRH no hipotálamo e altos níveis circulantes de ACTH (23).

Apesar da hiperatividade do eixo HPA na DM não ser totalmente compreendida, acredita-se que existam dois processos envolvidos com o aumento dos níveis circulantes de glicocorticoide: i) aumento de fatores ativadores do eixo HPA, como o CRH e ACTH; ii) e falha do *feedback* negativo. Este último foi observado em experimentos com administração exógena de corticoide, isto é, indivíduos diabéticos que receberam glicocorticoides não apresentaram diminuição nos níveis circulante deste, ficando claro a falha no processo de retrocontrole negativo do eixo HPA. Corroborando essa teoria, dados anteriores do grupo demonstraram um aumento nos níveis plasmáticos de ACTH, assim como da expressão de seu receptor, MC2R, na adrenal de ratos diabéticos, em contrapartida, estes animais apresentaram diminuição da expressão de GR e MR na glândula hipófise (24).

Sabe-se que no quadro da fisiopatologia da DM existe o aumento circulante de ativadores de TLR4, assim como o aumento de sua expressão nos túbulos proximais renal, células endoteliais e monócitos. Por fim, sabe-se que mediadores inflamatórios como TNF- α e citocinas provenientes da ativação do TLR4 também estão aumentados nesses indivíduos (25). Por outro lado, em recente estudo realizado pelo grupo, conseguimos observar que a diminuição da expressão do receptor ativado por proliferação de peroxissoma (PPAR) γ na hipófise e adrenal está envolvido com a hiperatividade do eixo HPA em ratos diabéticos, uma vez que ao ser ativado, este receptor leva a diminuição dos níveis plasmáticos de corticosterona (24). O PPAR γ é um fator de transcrição que quando ativado é endereçado ao núcleo e se liga ao receptor retinoide X (RXR) para promover sua ação. As regiões alvo do PPAR γ no DNA são denominados elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPREs). Diversas funções são atribuídas ao PPAR γ , entre elas o metabolismo adipogênico e na homeostase da glicose, sendo inclusive um alvo terapêutico na DM (26, 27). Diversas vias de sinalização podem suprimir a expressão e ativação do PPAR γ , entre elas a ativação do receptor do tipo toll 4 (TLR4) (28, 29). A ativação do TLR4 tem como principal função indução de processos inflamatórios, entretanto, diversos estudos associam esse receptor ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como aterosclerose e DM (30, 31). Pacientes

diabéticos apresentam aumento na expressão do TLR4 em monócitos, além do aumento de ativadores endógenos do TLR4 entre eles, Hsp60, HMGB1 e alguns ácidos graxos não-esterificados (31-34). Estudos demonstraram que a ativação do TLR4 em células β pancreáticas está envolvida ao aumento do estresse oxidativo levando a maior apoptose celular, o que poderia contribuir para a fisiopatologia da DM (35, 36). Por fim, a ativação do TLR4 em células adenocorticais está relacionada com a maior produção e liberação de glicocorticoide (37).

1.4 TLR4

Os TLRs fazem parte da família mais bem estudada dos receptores de reconhecimento à patógenos (PRRs). Os TLR são proteínas transmembranares altamente conservadas que desempenham papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos microbianos durante a resposta inata, bem como, na geração de sinais para a produção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias (38). Atualmente, foram descritos dez membros de TLRs em humanos e treze em roedores. A expressão dos TLRs pode dar-se de duas formas: i) na membrana plasmática; ii) em membranas endossomais no interior da célula. A descrição mais bem aceita para a ativação dos TLRs é através da fosforilação das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF, o que leva a produção de citocinas, incluindo interferon (IFN) do tipo I e TNF- α (39). Vale ressaltar que a maioria dos TLRs utilizam o MyD88 como molécula adaptadora, com exceção de TLR3 e, do próprio TLR4 que também pode utilizar TRIF(39).

De forma simplificada, o TLR ao ser ativado irá promover a fosforilação de MyD88 e, posterior ativação de TRAF6. Em seguida TRAF6 irá gerar a poliubiquitinação da molécula TAK-1, que por sua vez, está ligada ao complexo de subunidades TAB1, TAB2 e TAB3. O complexo TAB ao interagir com as ubiquitinas geradas por TRAF6 irá ativar TAK1. A molécula TAK1 está envolvida na ativação de NF κ B e MAPKs. A ativação das MAPKs resulta na ativação do fator de transcrição AP-1. A ativação dos TLRs pela molécula adaptadora TRIF irá ocorrer através da interação de TRIF com TRAF3 e TRAF6, sendo este último responsável pelo recrutamento da cinase RIP-1. A RIP-1 interage com o complexo TAK1 e leva a ativação de NF κ B e MAPKs promovendo a produção de mediadores pró-inflamatórios. Por outro lado, TRAF3 recruta cinases que levam a fosforilação de IRF3, sendo este transportado ao núcleo para promover a transcrição da proteína interferon (IFN) do tipo I (Figura 4) (39).

O TLR4 é o único representante da família *toll* que consegue ativar as duas vias de sinalização, tanto a de MyD88 quanto de TRIF. O lipopolissacarídeo (LPS) é o ativador exógeno mais bem caracterizado do TLR4, sendo este um padrão molecular associado à patógenos (PAMP) presente na parede de bactérias gram-negativas. Sabe-se que para a ativação do TLR4 pelo LPS é necessário a presença do co-receptor CD14, uma proteína ancorada a membrana plasmática com glicofosfatidilinositol, e MD-2, importante para o reconhecimento do LPS. Sendo assim, formado o complexo TLR4-CD4-MD2-LP, este pode promover ativação celular de duas maneiras, i) ativa MyD88 que está ancorado a membrana plasmática e gera todo o sinal explicitado acima; ii) este complexo será endocitado com o auxílio de ITAMs para a ativação da via de sinalização mediada por TRIF (40).

Estudos demonstraram que o TLR4 pode ser chave entre processos inflamatórios e sinais metabólicos observados na DM. Isto é, o TLR4 tem sido estudado na DM por promover a resistência insulínica. Estudos demonstram o envolvimento de dois fenômenos para a menor sensibilidade a insulina: i) aumento de ácido graxos livres, como o ácido oleico e esteárico; ii) mudança na microbiota intestinal (41). Portanto, dados demonstraram que animais mutantes para a sinalização de TLR4 (C3H.HEJ) quando submetidos a uma dieta hiperlipídica apresentaram maior sensibilidade a insulina em vários tecidos, incluindo cerebral, muscular e hepático (42, 43).

A associação entre alterações na microbiota intestinal e DM tem sido cada vez mais estudada. Alterações em determinados grupos de bactérias constituintes da microbiota intestinal podem levar ao quadro de resistência a insulina, resultando na maior chance de desenvolvimento da DM. Entretanto, bactérias probióticas demonstraram o efeito oposto, sendo protetoras do desenvolvimento de DM. O balanço entre constituintes da microbiota intestinal parece ser fundamental no desenvolvimento ou proteção ao desenvolvimento de resistência a insulina observada na DM. O aumento de bactérias gram-negativas e, posterior, passagem de LPS para circulação tem sido apontado como principal ligação entre as mudanças na microbiota intestinal e ativação de TLR4 em doenças como DM e doença de Alzheimer (41).

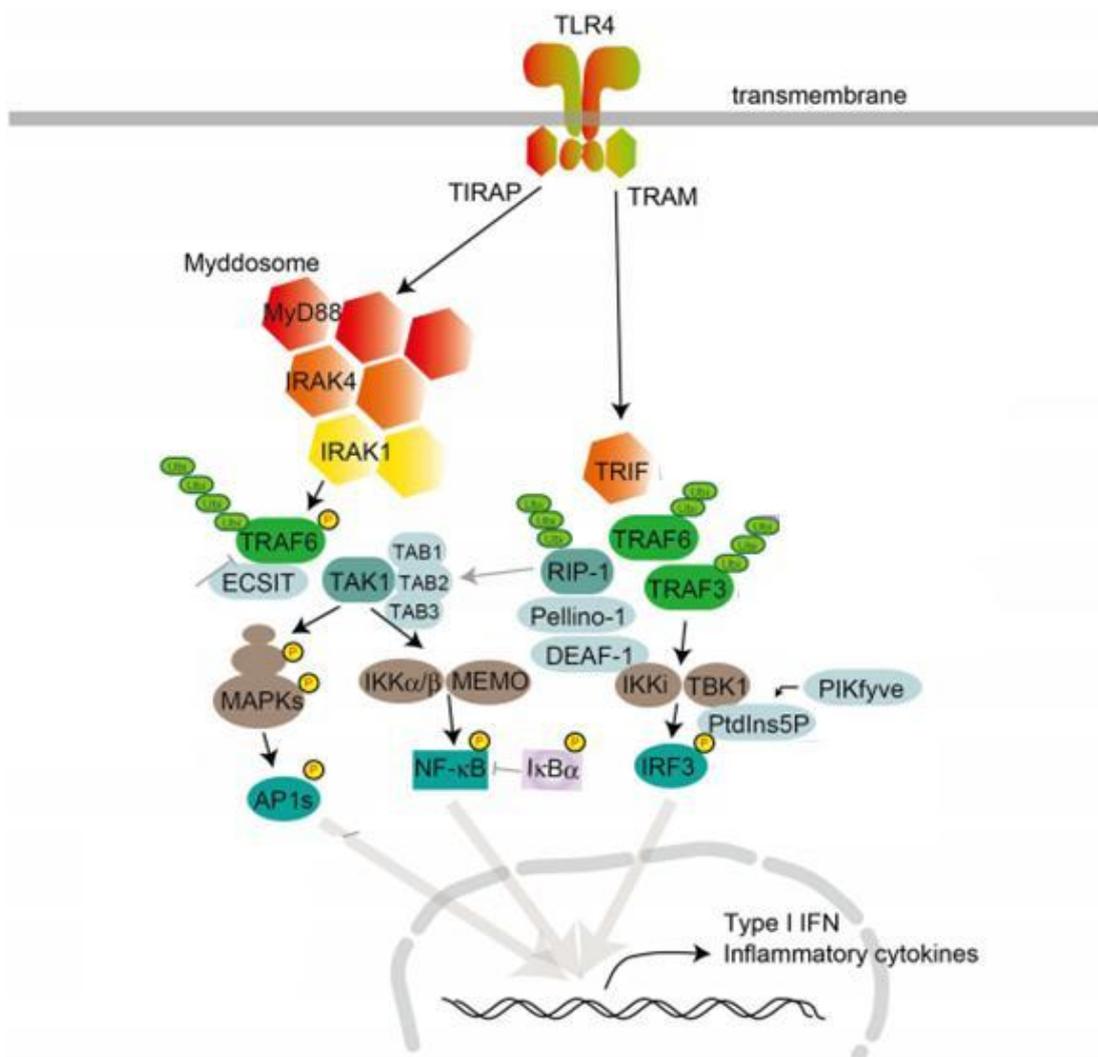


Figura 1.4. Vias de sinalização de TLR4. AP1: Proteína ativadora-1; IRF3: Fator regulatório Interferon-3; IKK: complexo IKB; MyD88: Molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88; MAPKs: Proteínas cinases ativadas por mitógeno; NFκB: Fator nuclear kappa B; AP1: TLR4: *Toll like receptor 4*; TIRAP: Proteína adaptadora contendo o domínio TIR; TRAF6: Fator associado ao receptor TNF 6; TRAM: Molécula adaptadora associada a TRIF; TRIF: Domínio TIR contendo adaptador indutor de IFN-beta; TAK-1: Fator ativado de crescimento β-cinase 1. Fonte: Adaptado Takumi Kawasaki, 2014.

1.5 Microbiota intestinal

A microbiota é considerada um organismo a parte ao ser humano e apresenta diversas funções em seu hospedeiro. O intestino é o órgão que contém o maior quantitativo e o mais diversificado número de espécimes de microrganismos associado ao ser humano. A microbiota intestinal é composta de bactérias, archaea, fungos e vírus. Diversos estudos demonstram que a maioria dos constituintes da microbiota intestinal pertencem a dois filos principais, o *Firmicutes* e o *Bacteroidetes* (44-46).

Ao se analisar a microbiota, cada ser humano é único. A colonização da microbiota no indivíduo está relacionada a diversos fatores como vida uterina, meio de concepção (parto normal ou cesariana), alimentação, estilo de vida e uso de antibióticos. Ao longo do desenvolvimento infantil, a microbiota intestinal é muito instável e pode sofrer modificações súbitas até os 2-3 anos de idade, idade essa que a composição da microbiota se assemelha ao de um adulto. Sabe-se que durante esse período inicial da vida é crucial que haja o estabelecimento da homeostase entre hospedeiro-microbiota, caso contrário, podendo ter reflexos a longo prazo na saúde desse indivíduo, como o desenvolvimento de doenças metabólicas e doença inflamatória intestinal. (44)

Isto é, durante o período inicial da colonização da microbiota, o hospedeiro é bombardeado com antígenos necessários para a maturação do intestino e do sistema imunológico, assim como órgãos mais distais. Esse conhecimento se sustenta em experimentos que demonstram que camundongos *germ-free* apresentam aumento de células imunes em órgãos como intestino e pulmão comparado ao grupo controle. E ao serem colonizados com a microbiota de animais controles nos primeiros dias de vida existe a reversão deste fenótipo, diferentemente quando são colonizados na vida adulta (47).

A microbiota intestinal apresenta uma forte comunicação com as células do hospedeiro, sendo assim, é atribuída a microbiota funções como diferenciação celular, modulação do sistema imune e proteção contra a colonização de microrganismos patogênicos ao indivíduo (44, 48). O hospedeiro se relaciona com a microbiota intestinal de várias maneiras, entre elas, através da produção de peptídeos antimicrobianos e IgA pelas células imunes para controle da densidade microbiana (49).

Além dos efeitos mencionados, a microbiota intestinal exerce importantíssimos efeitos metabólicos sob o hospedeiro. Isto é, devido à baixa capacidade do indivíduo absorver polissacarídeos, absorvendo predominantemente carboidratos simples, a microbiota intestinal utiliza desta fonte oriunda da dieta para promover diversas ações. Através da transformação

de polissacarídeos em monossacarídeos e, posteriormente, a fermentação destes, bactérias comensais produzem ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) e gases (CO₂ e H₂) (50). Os principais SCFAs são o acetato, propionato e butirato. Constituintes do filo *Bacteroidetes* produzem especialmente o acetato e propionato, sendo o butirato produzido pelos constituintes do filo *Firmicutes* (50).

Os efeitos metabólicos associados aos SCFAs são muitos, sendo eles: i) redução da glicemia, o que leva ao quadro de hipoglicemia; ii) inibição da glicólise e estimulação da lipogênese e gliconeogênese; iii) controle da produção de colesterol; iv) regulação da ação da leptina; v) regulação da atividade cinética intestinal, assim com o transporte de fluídos e atividade muco protetora. Por outro lado, a ação apenas do butirato tem como funções: i) ser fonte energética aos colonócitos; ii) controle da translocação bacteriana; iii) estimulação de proteínas justapostas; iv) produção de mucina (46, 50, 51). Outro papel atribuído a microbiota intestinal é a manutenção da permeabilidade intestinal. Em nível de conhecimento, a barreira intestinal é composta pela microbiota, muco, células epiteliais e por fim, células imunes inatas e adaptativas que formam o tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT, do inglês *gut-associated lymphoid tissue*).

A partir dos efeitos metabólicos citados, alterações na microbiota intestinal têm cada vez mais sido relacionadas a doenças metabólicas como obesidade e DM. Dados da literatura demonstraram que camundongos *germ-free* quando recebiam transplante da microbiota de animais obesos, desenvolviam obesidade em duas semanas. E que o mesmo não acontecia com os camundongos *germ-free* que receberam o transplante da microbiota de animais não-obesos (52). Anos depois, Jeffrey Gordon e cols, demonstraram diferença na composição da microbiota de pacientes obesos e não-obesos. Mais especificamente, uma diminuição nos representantes do filo *Bacteroidetes* e aumento de constituintes do filo *Firmicutes* na microbiota intestinal de pacientes obesos (50, 53).

1.6 DM x TLR4 x Microbiota

A DM do tipo 1 é uma doença autoimune associada ao aumento de células T que promovem a destruição de células β pancreáticas. Porém, ao longo do tempo, estudos demonstram que a ideia que se tinha que esse processo acontecia apenas por fatores genéticos estão sendo cada vez mais desacreditados. O desequilíbrio da relação entre microbiota e hospedeiro vem cada vez mais sendo associado a doenças autoimunes como o caso da DM1

(54). Devido à complexidade da microbiota intestinal é difícil associar uma determinada linhagem de patógenos com o desenvolvimento ou prevenção da DM.

Como descrito anteriormente, a microbiota pode modular diversas respostas no hospedeiro desde a imunológica até a metabólica. Sabe-se a importância dos TLRs para o reconhecimento de PAMPs presentes em constituintes da microbiota. Sendo assim, entende-se que através da molécula adaptadora MyD88 a maioria dos TLRs são ativados. Foi observado que a ativação do TLR2 e TLR4 na DM pela microbiota pode gerar diversos estímulos ao hospedeiro, podendo esses de cunho pró- ou anti-inflamatórios (55). Porém, pouco se sabe quais estímulos estão relacionados com a tolerância a antígenos próprios ou a autoimunidade. Dados da literatura demonstram que animais diabéticos não-obesos (NOD) quando tiveram uma deleção em MyD88 apresentaram efeito protetor ao desenvolvimento da DM. Além disso, fica evidente o papel protetor da microbiota, uma vez que, animais NOD MyD88^{-/-} *germ-free* perdem esse efeito e desenvolvem o quadro da insulite típica da DM1 (55).

A microbiota intestinal, assim como o eixo HPA tem um rápido desenvolvimento nos primeiros anos de vida do indivíduo, sendo facilmente afetados por eventos ambientais circundantes. O estresse no início da vida predispõe ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como depressão e ansiedade, além de transtornos gastrointestinais como síndrome do intestino irritável. Sendo assim, acredita-se fortemente em uma comunicação entre o eixo HPA e a microbiota intestinal, porém não ainda não está claro como isso acontece (56). Estudos demonstraram que camundongos submetidos a estresses crônicos como calor, barulho, entre outros, apresentaram alteração na microbiota intestinal. Além disso, a composição da microbiota intestinal pode estar relacionada a padrões comportamentais como ansiedade e depressão em animais que passaram pelo estresse da separação materna, sendo este fenótipo não observado em animais *germ-free* (57). Por outro lado, acredita-se que mudanças na microbiota intestinal também podem ativar o eixo HPA de forma indireta, ou seja, através do sistema imunológico. Sendo assim, citocinas induzidas pela microbiota seriam capazes de ativar o eixo HPA, e por consequência levar o aumento de corticoide, porém sendo necessários mais experimentos para entender essa relação. Entretanto sabe-se que o eixo HPA pode ser ativado de formas não canônicas como, por exemplo, pela administração de LPS culminando em um aumento de corticoide circulante (11). Vale ressaltar que a microbiota apresenta componentes que apresentam o LPS em sua parede celular. Portanto, essa seria mais hipótese de como a microbiota intestinal poderia ativar o eixo HPA.

2 HIPÓTESE

A hiperatividade do eixo HPA em indivíduos diabéticos é bem caracterizada, porém os mecanismos envolvidos não são totalmente elucidados. Dados anteriores do grupo demonstraram uma relação entre a hiperatividade do eixo HPA e a menor expressão de PPAR γ na hipófise e adrenal de animais diabéticos. Dados da literatura associam uma relação entre a menor expressão de PPAR γ com uma maior expressão/ativação de TLR4 em macrófagos. Além disso, animais diabéticos apresentaram aumento na expressão de TLR4 em monócitos e de ativadores circulantes deste receptor, como HGMB1 e ácidos graxos não-esterificados. Por outro lado, sabe-se que o clássico ativador de TLR4, o LPS, é capaz de ativar o eixo HPA culminando no aumento dos níveis circulantes de corticoide. Portanto, a hipótese que se tem é que há um aumento da expressão de TLR4 nas glândulas que compõem o eixo HPA de indivíduos diabéticos, e por consequência, a ativação deste receptor pode ser um dos fatores que levam a hiperatividade do eixo HPA na DM. Em suma, entender melhor a relação entre o receptor TLR4 na hiperatividade do eixo HPA na DM faz-se necessário a fim estudar novos alvos terapêuticos que possam melhorar a vida do paciente diabético.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do TLR4 na hiperatividade do eixo HPA em indivíduos diabéticos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de TLR4 na hipófise e adrenal de animais diabéticos;
- Avaliar o efeito da ativação de PPAR γ sobre a expressão de TLR4 nas glândulas adrenal e hipófise em animais diabéticos;
- Avaliar o efeito da ativação de TLR4 sobre a hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos;
- Avaliar a quantificação de níveis endógenos de ativadores de TLR4 em animais diabéticos;
- Avaliar o papel da microbiota na ativação de TLR4 no eixo HPA em animais diabéticos;

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Os animais utilizados neste projeto foram oriundos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz. Os procedimentos experimentais realizados nessa dissertação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz (L-027/2016). Ratos Wistar machos utilizados nos experimentos estavam pesando por volta de 200 a 300 gramas. Além disso, também foram utilizados camundongos da cepa Swiss-Webster e mutantes para sinalização de TLR4 (C3H.HeJ), além de sua linhagem selvagem para controle (C3H.He). Os camundongos iniciaram os experimentos pesando por volta de 20 g. Todos os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada entre 23 a 25°C e acesso livre à ração e água, além de serem submetidos a ciclo de claro e escuro (12h no claro/ 12h no escuro não invertido).

4.2 Indução da DM

Depois de submetidos ao jejum de 12h, a DM foi induzida através de uma única injeção intravenosa de aloxana, sendo nos camundongos em uma concentração de 65 mg/Kg e nos ratos 40mg/Kg. Vale ressaltar que o grupo controle foi submetido ao mesmo estresse, porém foi injetada solução salina 0,9%. Nos experimentos foram considerados animais diabéticos apenas aqueles que apresentaram valores de glicose acima de 250 mg/dL de sangue (24). O modelo de DM instaurado nessa dissertação foi de *Diabetes mellitus* do tipo I.

4.3 Tratamentos

4.3.1 Rosiglitazona

Três dias após a indução da DM, ratos Wistar foram tratados diariamente por via intraperitoneal com agonista de PPAR γ (Rosiglitazona) na concentração de 0,5mg/Kg em 200 μ l (24). O tratamento foi realizado por 17 dias consecutivos, sendo os animais eutanasiados no vigésimo primeiro (21°) dia de experimento. Animais não-tratados receberam o veículo utilizado, dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 0,05% em 200 μ l.

4.3.2 Antagonista de TLR4 (TAK-242)

Após 7 dias da administração do diabetogênico, camundongos Swiss-Webster foram tratados diariamente por via intraperitoneal com antagonista de TLR4 (TAK-242) na concentração de 3mg/Kg em 200µl (58). O tratamento foi realizado por 14 dias consecutivos, sendo os animais eutanasiados no 21º dia de experimento. Animais não-tratados receberam o veículo utilizado, DMSO, na concentração de 0,2% em 200µl.

4.3.3 Coquetel de antibiótico

Sete dias após a indução da DM, foi administrado em água de beber de camundongos Swiss-Webster um coquetel de antibiótico contendo Metronidazole, Ampicilina e Neomicina, todos na concentração de 1g/L (59). Os animais tiveram acesso a água de beber com o coquetel durante 24 horas por dia desde o início do tratamento. O tratamento foi realizado por 14 dias, sendo os animais eutanasiados no 21º dia de experimento.

4.4 Estímulo com LPS

Ratos Wistar foram mantidos diabéticos até o 21º dia, no dia da eutanásia receberam uma injeção intraperitoneal contendo LPS (100ng/cavidade) 30 min, 1 h ou 2 h antes de serem eutanasiados (60). Os animais que não receberam LPS passaram pelo mesmo estresse, sendo injetado salina 0,9%.

4.5 Quantificação da glicose sanguínea

Com o auxílio de um glicosímetro (Johnson & Johnson) foi realizada a quantificação da glicemia através de um pequeno corte na extremidade caudal dos animais. Vale ressaltar que tal quantificação foi realizada no dia anterior a eutanásia dos animais, a fim de não incluir este fator de estresse nas nossas análises.

4.6 Quantificação de hormônios circulantes

4.6.1 Obtenção das amostras

A fim de analisar o ponto mais baixo da curva do ciclo circadiano (nadir) dos roedores, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ por volta das 8 horas da manhã. O sangue foi coletado da artéria abdominal através de uma seringa contendo solução de heparina (400UI/mL) em salina. Em sequência, o sangue coletado foi adicionado ao tubo de

hemólise e centrifugado por 10 min a 4°C em uma rotação de 433 xG. Posteriormente, foram feitas alíquotas contendo plasma e armazenados a -20°C para conservação da amostra.

4.6.2 Quantificação das amostras

A quantificação dos níveis plasmática de corticosterona e de insulina foi feita por radioimunoensaio (RIA) com kits da MP Biomedicals. No ensaio, foi analisada a competição dos hormônios marcados com I125 radioativo contidos no Kit e da amostra pela ligação antígeno específico. Posteriormente, quantificou-se esta ligação por um contador de partículas gama e, o resultado foi comparado a uma curva padrão, realizado no ensaio (ISOMEDIC-ICN).

4.7 Análise de permeabilidade intestinal

4.7.1 Obtenção das amostras

Com o intuito de analisar a permeabilidade intestinal, camundongos swiss passaram por um jejum de 12 horas. Ao término desse período, receberam uma solução contendo Dextran 4000 FITC na concentração de 600mg/Kg por gavagem (61). Após uma hora, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e retirado o sangue através de uma seringa contendo heparina (400UI/ml). O sangue foi centrifugado em uma rotação de 950xG por 20 min a uma temperatura de 4°C. Após isso, foram realizadas alíquotas de plasma e armazenadas em temperatura de -80°C. Todas os processos de manuseio do sangue/plasma foram protegidos da luz.

4.7.2 Quantificação das amostras

Para a preparação das amostras, as alíquotas de plasma foram diluídas em salina tamponada com fosfato (PBS) numa proporção de um para um (1:1). Após esse procedimento, 100 µl da amostra diluída foi plaqueada em placa de 96 poços para análise de fluorescência (placa preta). Foi elaborada uma curva padrão com variação entre 0,195 a 50 µg/mL de Dextran 400FITC em PBS. A placa foi lida em uma leitora de fluorescência com uma excitação de comprimento de onda de 485nm e emissão de 528nm.

Uma vez que a molécula de dextran tem alto peso molecular e não consegue ultrapassar o tecido intestinal integro, caso haja alguma perturbação nesse sistema haverá uma maior incorporação dessa molécula no plasma. Sendo assim, de uma maneira indireta, essa técnica

nos permite analisar a relação de forma diretamente proporcional à permeabilidade intestinal e a quantidade de dextran encontrado no plasma do animal.

4.8 Análise de Hipertrofia das adrenais

A análise macroscópica da adrenal no parâmetro de hipertrofia se fundamenta em uma equação onde há a relação entre o peso da adrenal e o peso corporal do animal (Equação 1). Portanto, após a eutanásia do animal, a adrenal direita em relação ao experimentador foi retida e pesada, posteriormente, relacionada ao peso corporal do animal.

Equação 1: Equação que demonstra a fórmula utilizada para avaliar a hipertrofia da adrenal.

4.9 Imunohistoquímica

Após os animais serem eutanasiados em câmara de CO₂, foram coletados os órgãos a serem estudados (hipófise e adrenal) e, então, colocados em um fixador (millonig) por 48h como proteção à autolisinas e a possíveis danos causados por patógenos. Em seguida, os órgãos foram desidratados e incluídos em parafina, mantendo-se assim até a próxima etapa, onde foram cortados através de micrótomo com cortes de espessura de 5 µm. Os cortes foram adicionados a lâminas silanizadas que permitem com que haja maior aderência entre tecido e a lâmina terminando assim, o processo de obtenção do tecido na lâmina.

Com a realização da técnica, inicialmente fez-se a desparafinização das lâminas na estufa por uma 1h em temperatura de 60°C e, posteriormente, em banho de xilol (I e II) 5 min cada. Em seguida, foi feita a hidratação do tecido em banho de etanol contendo diferentes concentrações (100%, 90%, 80% e 70%) por 3 min cada. O próximo passo foi a recuperação antigênica através de uma solução de citrato 5 mM em temperatura de 95°C, visando o melhor reconhecimento dos epítomos contidos no antígeno pelo anticorpo usado no ensaio. Fez-se o consumo das peroxidases endógenas por H₂O₂ 3% por 20 min. Além disso, o material foi, em seguida, incubado com solução contendo 2,5% de BSA, 1% de leite em pó e

soro fetal bovino (SFB) 8% por 3h com intuito de bloquear marcações inespecíficas.

Depois de passado o tempo do bloqueio, os tecidos contidos na lâmina foram incubados com anticorpo primário *overnight*. No dia seguinte, foram feitas duas lavagens com solução salina tamponada com Tris com Tween-20 (TBST) com o intuito de retirar-se o anticorpo primário que não havia se fixado ao seu epítipo, e adicionou-se o anticorpo secundário específico para o anticorpo primário usado no ensaio por 2h e 30min. Após esse processo, deu-se o início da revelação. Usou-se o substrato aminoetilcarbazol (AEC) por 20 min para revelar a amostra. As amostras foram lavadas em água corrente e, em seguida, coradas com hematoxilina de Harris por 10 s para delimitar e ajudar na visualização da estrutura do tecido. Ao final do processo, as lâminas foram montadas com solução de gelatina/glicerina e analisadas através de um microscópio óptico no aumento de 40x. A técnica de imunohistoquímica nos permite, através da relação antígeno/anticorpo, analisar moléculas desejadas em um tecido conhecido.

4.10 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O HPLC consiste em uma técnica que visa a separação de compostos químicos em solução. Tal separação dá-se através da migração da substância de interesse, através da fase estacionária, por intermédio de um fluido (fase móvel). Sendo assim, a amostra foi introduzida na coluna cromatográfica, onde era preenchida com a fase estacionária. O solvente utilizado no processo foi bombeado com vazão constante, sendo responsável pelo descolamento da amostra através da coluna. Portanto, as substâncias contidas na amostra que tiveram maior afinidade com a fase estacionária, demorou mais para serem arrastadas se diferenciando das que tinham menos afinidade. Ao final do sistema, houve um detector que foi responsável pela captação do sinal elétrico emitido pelas substâncias, as identificando baseado em padrões pré-estabelecidos. Esse procedimento foi feito em parceria com o Dr. Cassiano Albuquerque do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz para quantificar níveis séricos de ácidos graxos não-esterificados totais, ácido oleico e esteárico, a partir de amostras de plasma de ratos Wistar.

4.11 Soluções

4.11.1 TBS 1X:

- 90 mL de NaCl 0,85%
- 10 mL de tris-HCl 0,05 M
- pH 7,6

4.11.2 TBS-Tween 20:

- 250 µL Tween 20
- Tampão TBS 1x em q.s.p. 500 ml

4.11.3 AEC uso:

Fotossensível, colocar as substâncias nesta ordem:

- 9,5 mL de tampão acetato:

Preparo tampão acetato:

Solução 1: $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,1M

Solução 2: Ácido acético glacial – 575 µL em 100 mL de água destilada

Misturar 79 mL da solução 1 com 21 mL da solução 2

- pH 5,2

- 0,5 mL de AEC estoque

Preparo AEC estoque:

Solubilizar 120 mg de AEC em 15 mL de N,N-dimetilformamida

- 50 µL de H_2O_2 3%

4.11.4 Meio de montagem (gelatina/glicerina):

- 10 g de gelatina em pó
- 70 mL de glicerina
- 1 mL fenol

4.11.5 Millonig:

- 200 mL de HCHO

- 1800 mL de H₂O
- 37,2 g de NaH₂PO₄
- 8,4g de NaOH

4.12 Drogas utilizadas

- Aloxana monohidratada, Metronidazole, Ampicilina e Neomecina, H₂O₂, AEC, citrato de sódio dihidratado, LPS e parafina, foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).
- Gelatina em pó foi obtida na Reagen (Paraná, Brasil).
- Glicerina e álcool etílico absoluto foram obtidos da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil).
- Formaldeído, cloreto de potássio e xilol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Heparina sódica foi obtido da Roche (São Paulo, Brasil).
- Anticorpos policlonais foram obtidos da Santa Cruz “Biotechnology” (Califórnia, EUA).
- TAK242 e Rosiglitazona foram obtidos da Cayman.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) e, analisados estatisticamente, através da análise de variância (one way-ANOVA) seguido pelo teste Newman-Keuls. O teste t não pareado foi utilizado quando havia apenas dois grupos experimentais. Para ambos os testes, os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Ratos Wistar diabéticos apresentam aumento de TLR4 na hipófise e adrenal

Com o intuito de estabelecer o modelo de DM1, ratos Wistar foram submetidos a uma única injeção de aloxana (40mg/kg) por via intravenosa. Após 21 dias do início do experimento os animais foram eutanasiados, e em seguida foram feitas as análises. Observamos que animais diabéticos apresentaram um aumento significativo do índice glicêmico assim como os níveis plasmáticos de corticosterona quando comparados ao grupo não-diabético. Em paralelo, níveis séricos de insulina e o peso corporal se encontraram diminuídos nestes animais quando comparados aos animais não-diabéticos (Tabela 1).

Em sequência foi avaliada a expressão do receptor TLR4 nas glândulas hipófise e adrenal, que compõem o eixo HPA. Animais diabéticos apresentaram um aumento significativo da expressão do TLR4 (Figura 5.1.1B e 5.1.1E) quando comparados ao grupo não-diabético (Figura 5.1.1A e 4.1.1D) tanto na hipófise (Figura 5.1.1D e 5.1.1E) quanto na adrenal (Figura 5.1.1A e 5.1.1B), respectivamente. Os valores da quantificação de expressão de TLR4 nas glândulas hipófise e adrenal está representada nas figuras 5.1.1C e 5.1.1F, respectivamente.

Tabela 1: Diabetes induz o quadro de hiperglicemia, hipoinsulinemia, perda peso corporal e hipercorticoidismo em ratos Wistar

Parâmetro / Grupo	Não-diabético	Diabético
Glicemia (mg/dL)	101,0	555,3 ***
Insulina (μLU/mL)	81,81	13,07 ***
Peso corporal (g)	297,8	203,6 ***
Corticosterona (ng/mL)	210,0	505,8 **

Os valores representam a média de no mínimo 5 animais. *** p< 0,001 em comparação ao grupo não-diabético. ** p< 0,01 em comparação ao grupo não-diabético.

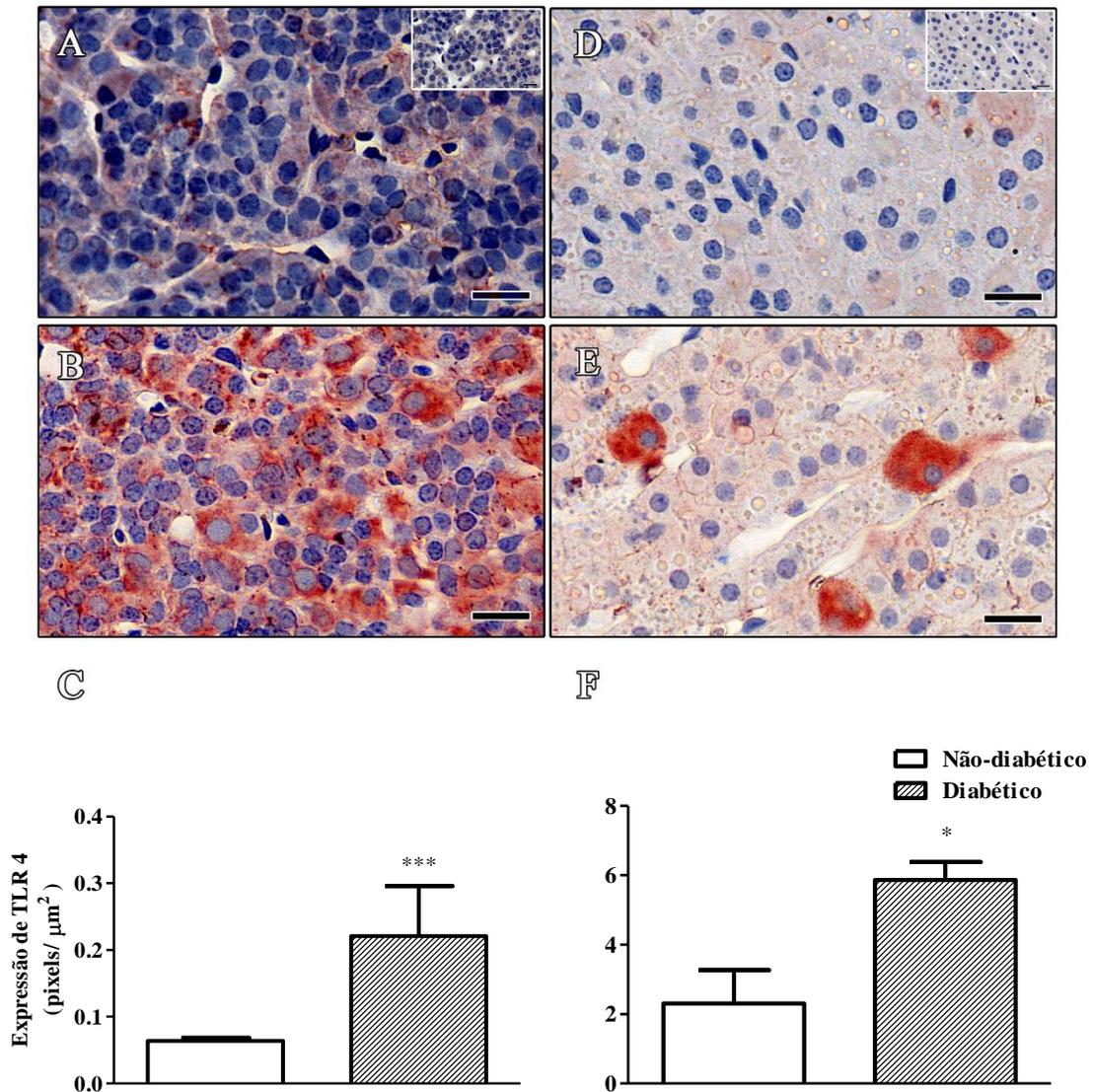


FIGURA 5.1.1 ANIMAIS DIABÉTICOS APRESENTAM AUMENTO NA EXPRESSÃO DE TLR4 TANTO NA HIPÓFISE QUANTO NA ADRENAL. As figuras acima representam a expressão de TLR4 pela técnica de imuno-histoquímica na hipófise e adrenal de ratos não-diabéticos (A e D) e ratos diabéticos (B e E). Os gráficos (C e F) são representam a quantificação da expressão de TLR4 na hipófise e na adrenal, respectivamente. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético. A reta preta representa $20\mu\text{m}$.

5.2 Ativação de PPAR γ reduz a expressão de TLR4 na hipófise e adrenal de animais diabéticos

Com o intuito de estabelecer uma relação entre a ativação de PPAR γ e expressão do TLR4, animais diabéticos foram tratados com agonista de PPAR γ , rosiglitazona. Confirmando dados acima, animais diabéticos apresentaram um aumento significativo na expressão de TLR4 na hipófise (Figura 5.2.1C) e adrenal (Figura 5.2.2C) quando comparados ao grupo não-diabético não-tratado (Figura 5.2.1A e 5.2.2A). O tratamento com rosiglitazona foi capaz de diminuir a expressão do TLR4 na hipófise (Figura 5.2.1D e 5.2.2D) e adrenal de animais diabéticos quando comparado a animais diabéticos não-tratados. Por fim, o tratamento com rosiglitazona provocou aumento na expressão do TLR4 na adrenal de animais controles tratados (Figura 5.2.2B), porém não apresentou efeito na glândula hipófise (Figura 5.2.1B) destes animais quando comprado a animais controles não-tratados (Figura 5.2.1A e Figura 5.2.2A).

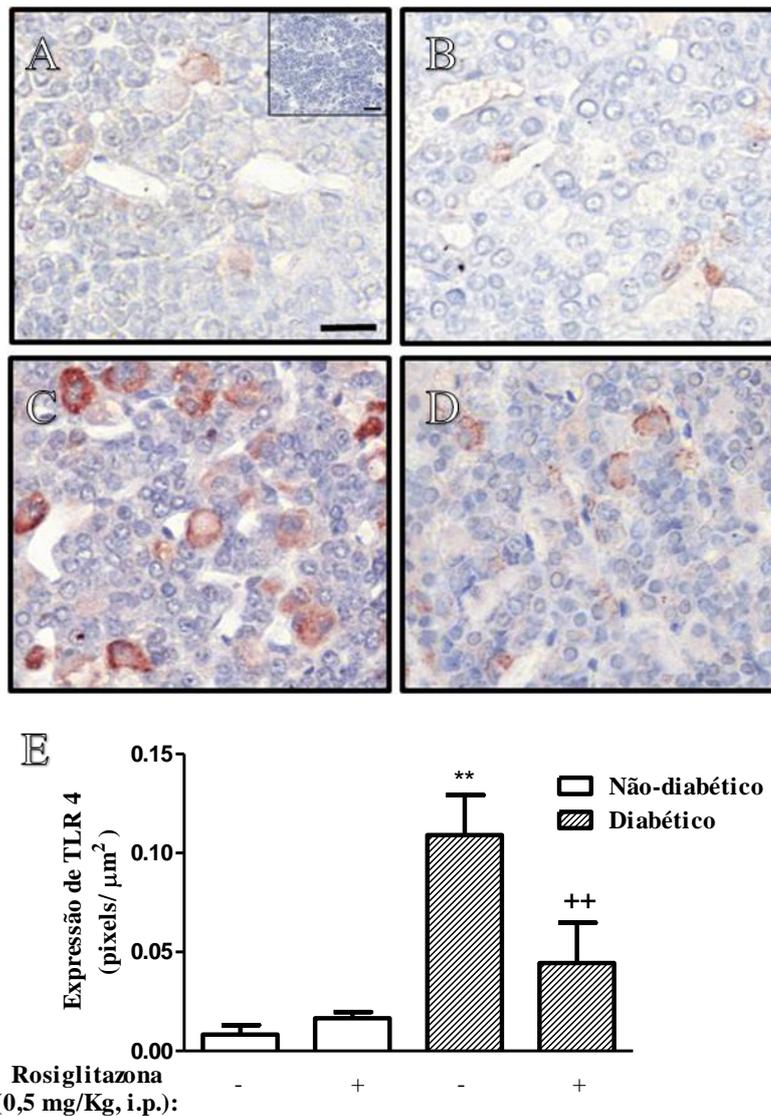


FIGURA 5.2.1: EFEITO DE ROSIGLITAZONA SOBRE A EXPRESSÃO DO TLR4 NA HIPÓFISE DE ANIMAIS DIABÉTICOS. As figuras acima representam a expressão de TLR4 na hipófise pela técnica de imuno-histoquímica de ratos não-diabéticos não-tratados com Rosiglitazona (A), ratos não-diabéticos tratados (B), ratos diabéticos não-tratados (C) e ratos diabéticos tratados (D). Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (DMSO 0,005%, i.p). O gráfico (E) contém valores representativos da expressão de TLR4 na hipófise de animais submetidos a tratamento com Rosiglitazona. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 3 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. + $p < 0,01$ em comparação ao grupo diabético não-tratado. A reta preta representa 20 μm .

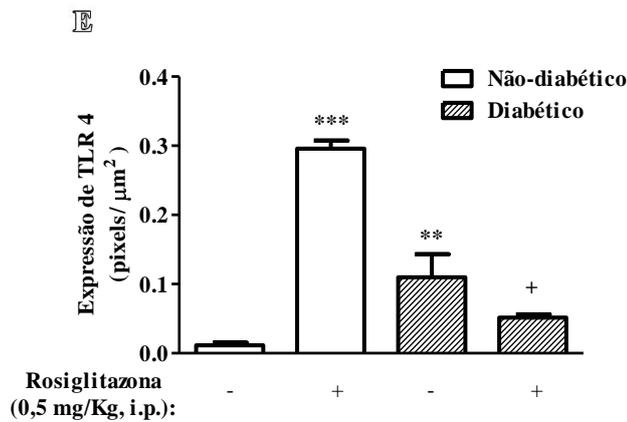
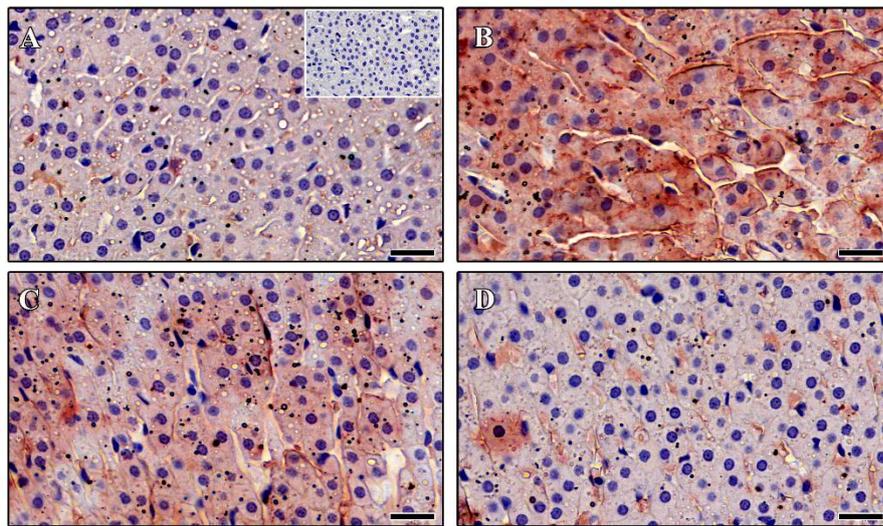


FIGURA 5.2.2: EFEITO DE ROSIGLITAZONA SOBRE A EXPRESSÃO DO TLR4 NA ADRENAL DE ANIMAIS DIABÉTICOS. As figuras acima representam a expressão de TLR4 na adrenal pela técnica de imuno-histoquímica de ratos não-diabéticos não-tratados com Rosiglitazona (A), ratos não-diabéticos tratados (B), ratos diabéticos não-tratados (C) e ratos diabéticos tratados (D). Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (DMSO 0,005%, i.p). O gráfico (E) contém valores representativos da expressão de TLR4 na adrenal de animais submetidos a tratamento com Rosiglitazona. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 3 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. + $p < 0,01$ em comparação ao grupo diabético não-tratado. A reta preta representa 20 μm .

5.3 Níveis aumentados de corticosterona observado em animais diabéticos dependem da ativação de TLR4

Uma vez que observamos um aumento na expressão do TLR4 nas glândulas hipófise e adrenal de animais diabéticos, nós formulamos a hipótese de que o TLR4 poderia estar participando na hiperatividade do eixo HPA observada nesses animais. Para confirmar tal hipótese, utilizamos uma cepa camundongos mutantes para o receptor TLR4, C3H.HeJ. Foram analisados os parâmetros de glicemia, peso corporal, níveis séricos de insulina, corticosterona plasmática e hipertrofia da adrenal em animais diabéticos mutantes para TLR4. Animais selvagens diabéticos apresentaram aumento nos níveis séricos de glicose (Figura 5.3.1A), assim como diminuição do peso corporal (Figura 5.3.1B) e insulina plasmática (Figura 5.3.2) acompanhada com aumento de corticosterona (Figura 5.3.3) e hipertrofia da adrenal (Figura 5.3.4) quando comparada aos animais selvagens não-diabéticos. A mutação do TLR4 em animais diabéticos não provocou nenhum efeito nos parâmetros de glicemia, peso corporal e insulina plasmática quando comparado a animais selvagens diabéticos. Entretanto, camundongos C3H.HeJ diabéticos não apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona e na relação peso da adrenal por peso corporal quando comparados a animais selvagens diabéticos.

De forma confirmatória aos dados encontrados com animais mutantes para TLR4, realizamos o tratamento com um antagonista de TLR4 visando concretizar o papel de TLR4 na hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos. Portanto, analisamos os mesmos parâmetros já descritos acima como glicemia (Figura 5.3.5A), peso corporal (Figura 5.3.5B), insulina plasmática (Figura 5.3.6), corticosterona plasmática (Figura 5.3.7) e por fim, hipertrofia da adrenal (Figura 5.3.8) de camundongos Swiss-Webster tratados com antagonista de TLR4 (TAK-242). Animais diabéticos apresentaram aumento nos níveis de glicose sanguínea, assim como diminuição do peso corporal e insulina plasmática, associado ao aumento nos níveis séricos de corticosterona e hipertrofia da adrenal quando comparados a animais não-diabéticos. O tratamento com TAK-242 não foi capaz de reverter o quadro de hiperglicemia, redução do peso corporal e hipoinsulinemia encontrada nos animais diabéticos. Por outro lado, o TAK-242 reverteu o hipercorticoidismo e a hipertrofia da adrenal observada em animais diabéticos. Por fim, o antagonista do TLR4 produziu uma hipertrofia na adrenal de animais não diabéticos quando comparada a animais controles não-tratados.

Tentando elucidar se animais diabéticos poderiam apresentar o aumento na atividade de TLR4, foi realizado uma imunohistoquímica para NFκB. Vale ressaltar, que NFκB é um fator de transcrição ativado na sinalização de TLR4. Animais diabéticos apresentaram aumento significativo na expressão de NFκB (Figura 5.3.9B) na hipófise quando comparado a animais não-diabéticos (Figura 5.3.9A). Os valores da quantificação de expressão de NFκB na hipófise estão representados no gráfico de barra (Figura 5.3.9C).

De forma a analisar se o aumento na densidade de TLR4 na hipófise e adrenal de animais diabéticos reflete em um aumento direto da atividade do eixo HPA, ratos Wistar diabéticos foram submetidos à estimulação com LPS em diferentes intervalos de tempo e foram analisados os parâmetros de hipertrofia da adrenal (Figura 5.3.10) e níveis plasmáticos de corticosterona (Figura 5.3.11). Animais controles estimulados com LPS apresentaram hipertrofia da adrenal acompanhada com hipercorticoidismo apenas no tempo 2h quando comparado a animais controles não-estimulados. Animais diabéticos apresentaram uma hipertrofia da glândula adrenal quando comparados a animais não-diabéticos não-estimulado, esse parâmetro não apresentou alteração mesmo ao serem estimulados com LPS. Por fim, animais diabéticos apresentam hipercorticoidismo quando comparado a animais controles não-estimulados, porém, apenas no tempo 2h a estimulação de LPS, animais diabéticos produziram mais corticosterona plasmática quando comparado a animais diabéticos não-estimulados.

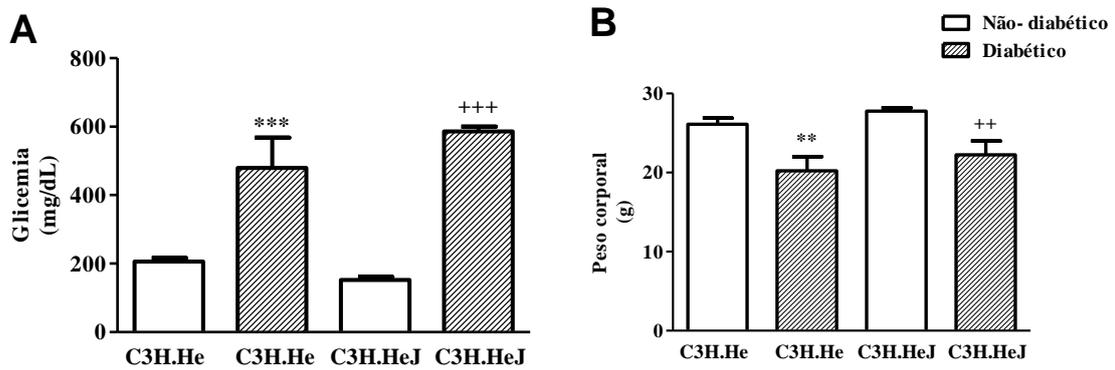


FIGURA 5.3.1: NÍVEL GLICÊMICO E PESO CORPORAL DE CAMUNDONGOS MUTANTES PARA TLR4 DIABÉTICOS. O gráfico representa valores séricos de glicose (A) e peso corporal (B) de animais mutantes para TLR4 (C3H.HeJ) em relação ao grupo não-diabético. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 3 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético selvagem. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo não-diabético selvagem. +++ $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético mutante. ++ $p < 0,01$ em comparação ao grupo não-diabético mutante.

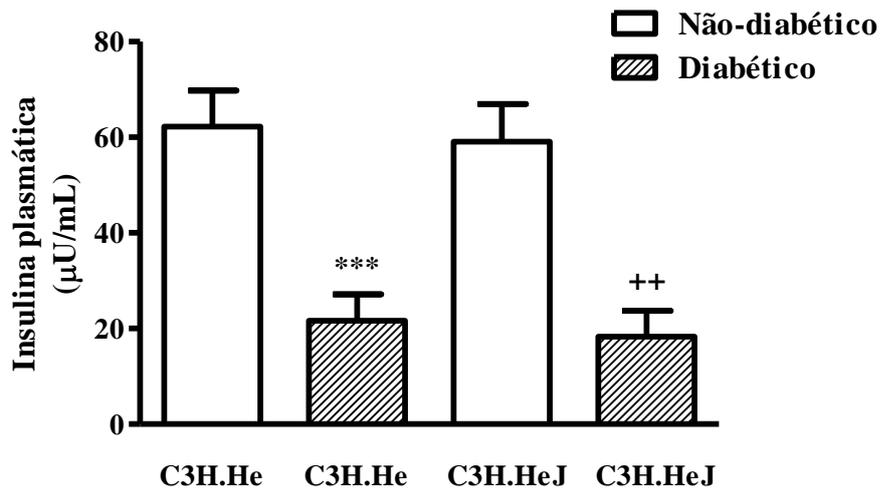


FIGURA 5.3.2: NÍVEL PLASMÁTICO DE INSULINA DE CAMUNDONGOS MUTANTES PARA TLR4 DIABÉTICOS. O gráfico representa valores séricos de insulina de animais mutantes para TLR4 (C3H.HeJ) em relação ao grupo não-diabético. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético selvagem. ++ $p < 0,01$ em comparação ao grupo não-diabético mutante.

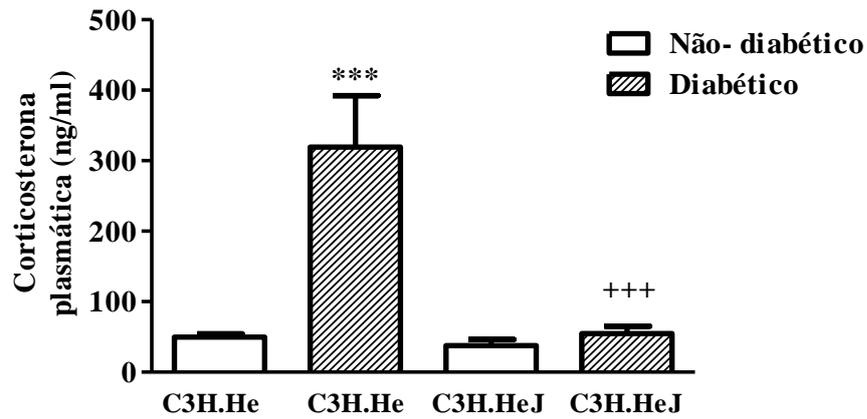


FIGURA 5.3.3: NÍVEL PLASMÁTICO DE CORTICOSTERONA DE CAMUNDONGOS MUTANTES PARA TLR4 DIABÉTICOS. O gráfico representa níveis plasmáticos de corticosterona de animais mutantes para TLR4 (C3H.HeJ) em relação ao grupo não-diabético. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 3 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético selvagem. +++ $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético selvagem.

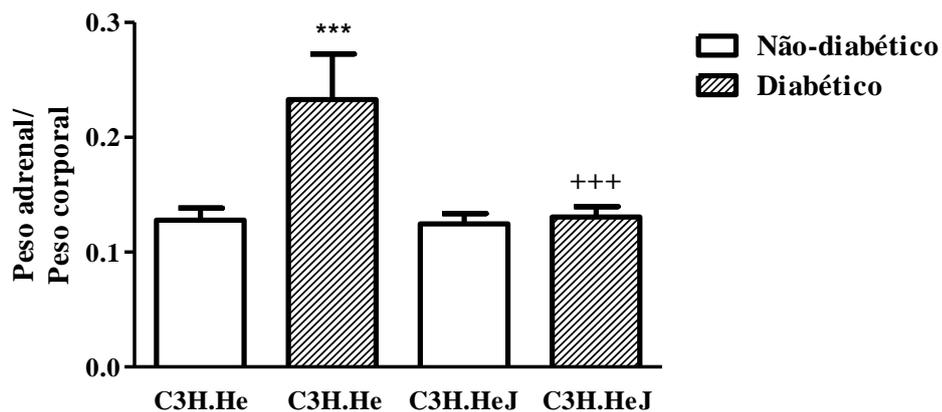


FIGURA 5.3.4: CAMUNDONGOS DIABÉTICOS MUTANTES PARA TLR4 NÃO APRESENTAM HIPERTROFIA DA ADRENAL. O gráfico representa relação entre o peso da adrenal por peso corporal de animais mutantes para TLR4 (C3H.HeJ) em relação ao grupo não-diabético. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético selvagem. +++ $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético selvagem.

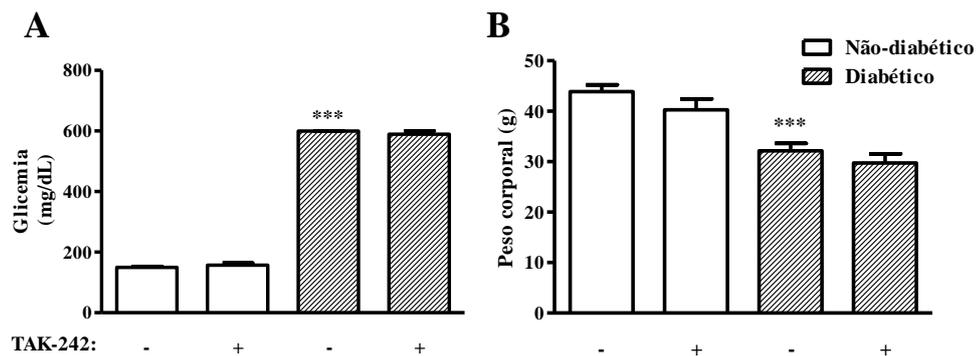


FIGURA 5.3.5: EFEITO DO ANTAGONISTA DE TLR4 (TAK-242) SOBRE O NÍVEL GLICÊMICO E PESO CORPORAL DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. O gráfico representa valores séricos de glicose (A) e peso corporal (B) de animais diabéticos tratados com TAK-242 (3mg/kg). Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (DMSO 0,2%). As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 7 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado.

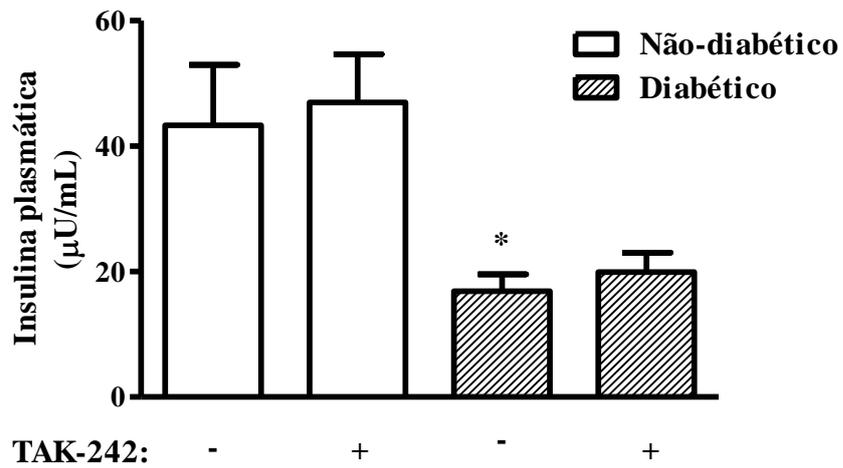


FIGURA 5.3.6: EFEITO DO ANTAGONISTA DE TLR4 (TAK-242) SOBRE A INSULINA PLASMÁTICA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. O gráfico representa valores séricos de insulina de animais diabéticos tratados com TAK-242 (3mg/kg). Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (DMSO 0,2%). As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 7 animais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado.

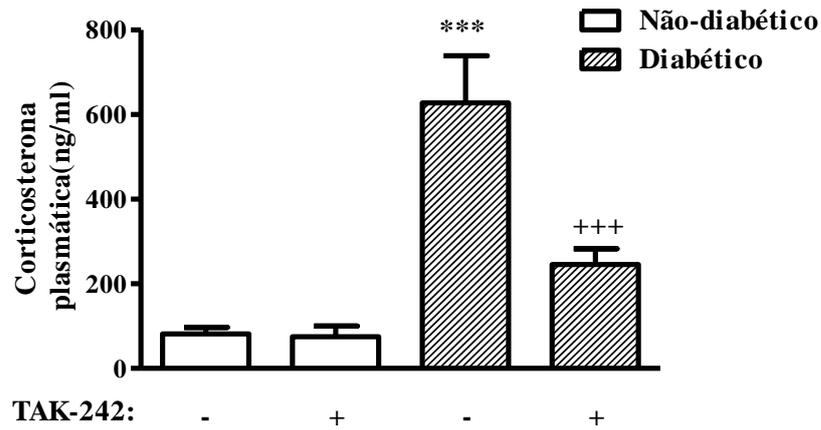


FIGURA 5.3.7: EFEITO DO ANTAGONISTA DO TLR4 (TAK-242) SOBRE A CORTICOSTERONA PLASMÁTICA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. O gráfico representa a quantificação de corticosterona plasmática de animais diabéticos tratados com TAK-242 (3mg/kg). Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (DMSO 0,2%). As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 7 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. +++ $p < 0,001$ em comparação ao grupo diabético não-tratado.

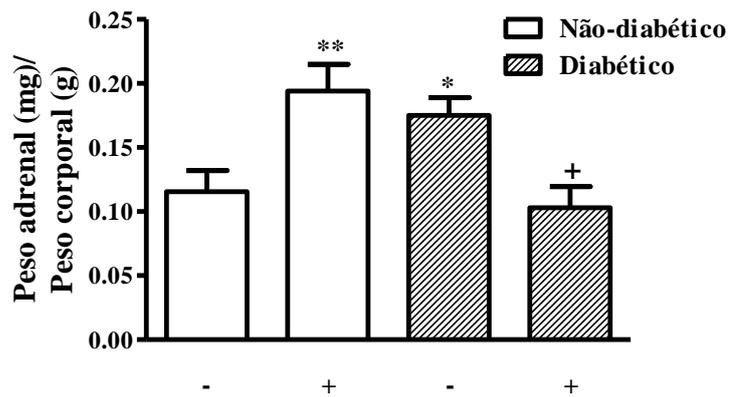


FIGURA 5.3.8: EFEITO DO ANTAGONISTA DE TLR4 (TAK-242) SOBRE HIPERTROFIA DA ADRENAL EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. O gráfico representa a relação do peso adrenal por peso corporal de animais diabéticos tratados com TAK-242, respectivamente. Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (DMSO 0,2%). As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 6 animais. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. + $p < 0,05$ em comparação ao grupo diabético não tratado.

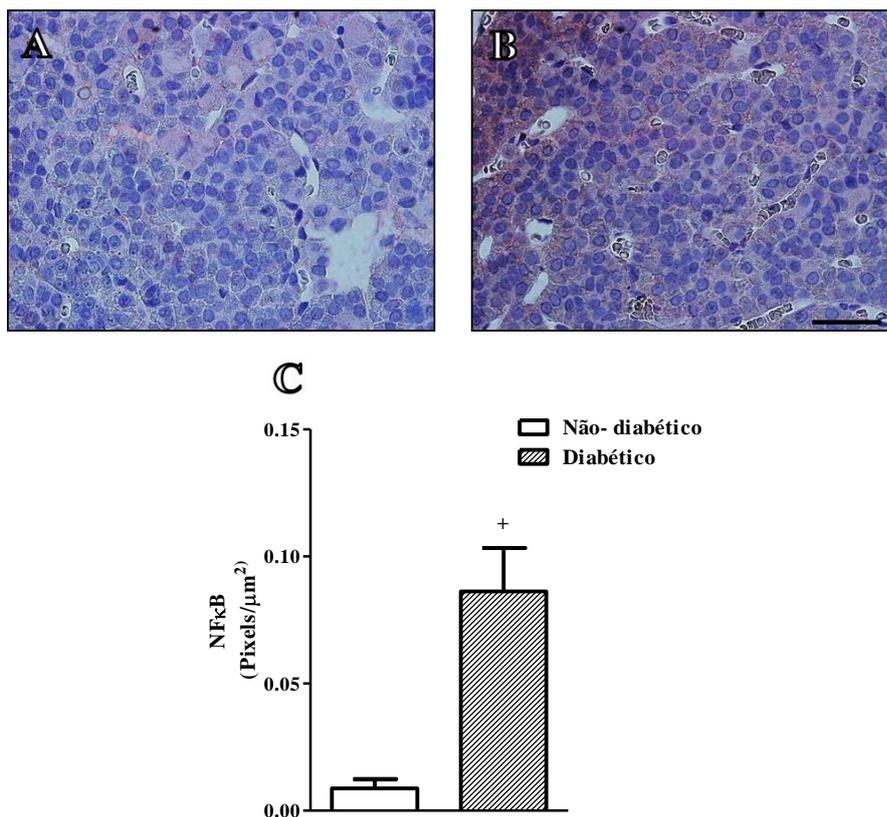


FIGURA 5.3.9: ANIMAIS DIABÉTICOS APRESENTAM AUMENTO NA EXPRESSÃO DE NFκB NA HIPÓFISE. As figuras acima representam a expressão de NFκB pela técnica de imunohistoquímica de ratos não-diabéticos (A) e ratos diabéticos (B). Os gráficos (C) são representam a quantificação da expressão de NFκB na hipófise, respectivamente. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético. A reta preta representa $40\mu\text{m}$.

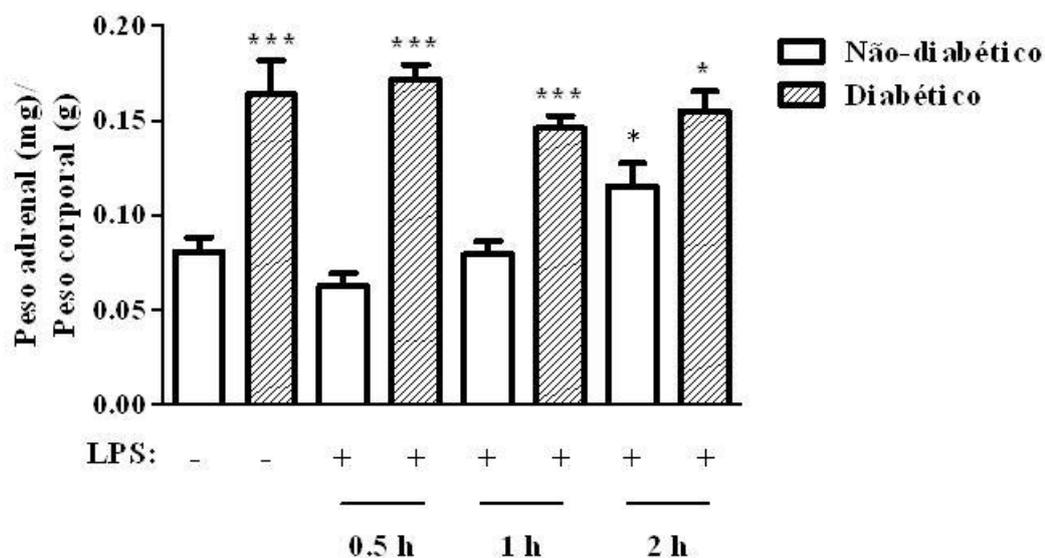


FIGURA 5.3.10: RATOS WISTAR DIABÉTICOS APRESENTAM HIPERTROFIA DA ADRENAL. O gráfico representa a relação entre o peso da adrenal por peso corporal de animais diabéticos estimulados com LPS (100ng/cavidade) em relação ao grupo não-diabético. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético não-estimulado. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético não-estimulado.

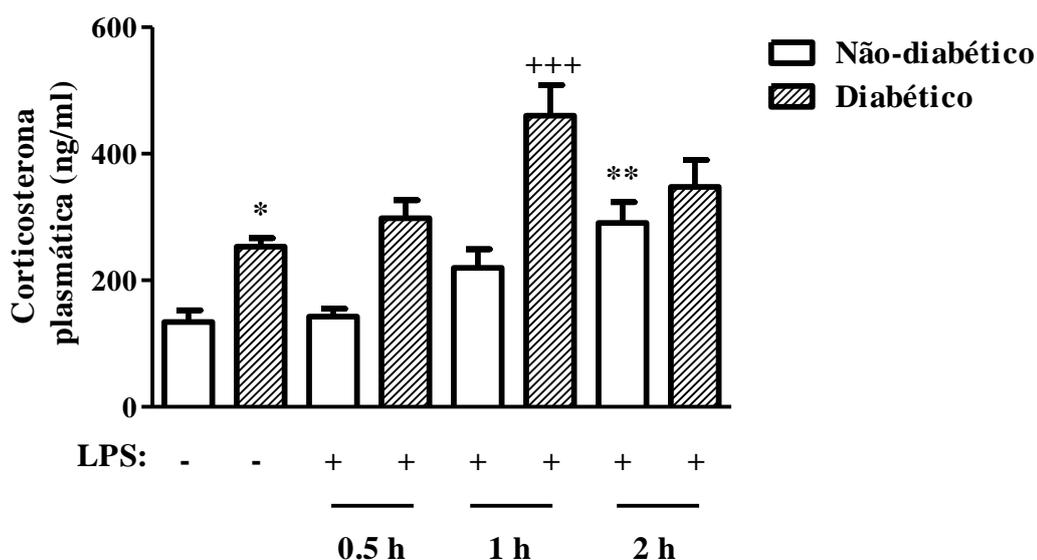


FIGURA 5.3.11: RATOS WISTAR DIABÉTICOS APRESENTAM HIPERCORTICOIDISMO ACENTUADO QUANDO SUBMETIDOS AO LPS. O gráfico representa quantificação de corticosterona plasmática de animais diabéticos estimulados com LPS (100ng/cavidade) em relação ao grupo não-diabético. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 6 animais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético não-estimulado. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo não-diabético não-estimulado. +++ $p < 0,001$ em comparação ao grupo diabético não-estimulado.

5.4 Animais diabéticos apresentam níveis circulantes de ativadores de TLR4 endógenos aumentados

O próximo passo foi realizar, através da técnica de HPLC, a quantificação de ácidos graxos não-esterificados totais, incluindo os ácidos oleico e esteárico, uma vez que estes são ativadores endógenos de TLR4. A Figura 5.4.1 nos explicita que ratos diabéticos apresentam um aumento significativo de níveis circulantes de ácidos graxos não-esterificados totais, ácido esteárico e ácido oleico quando comparados ao grupo não-diabético.

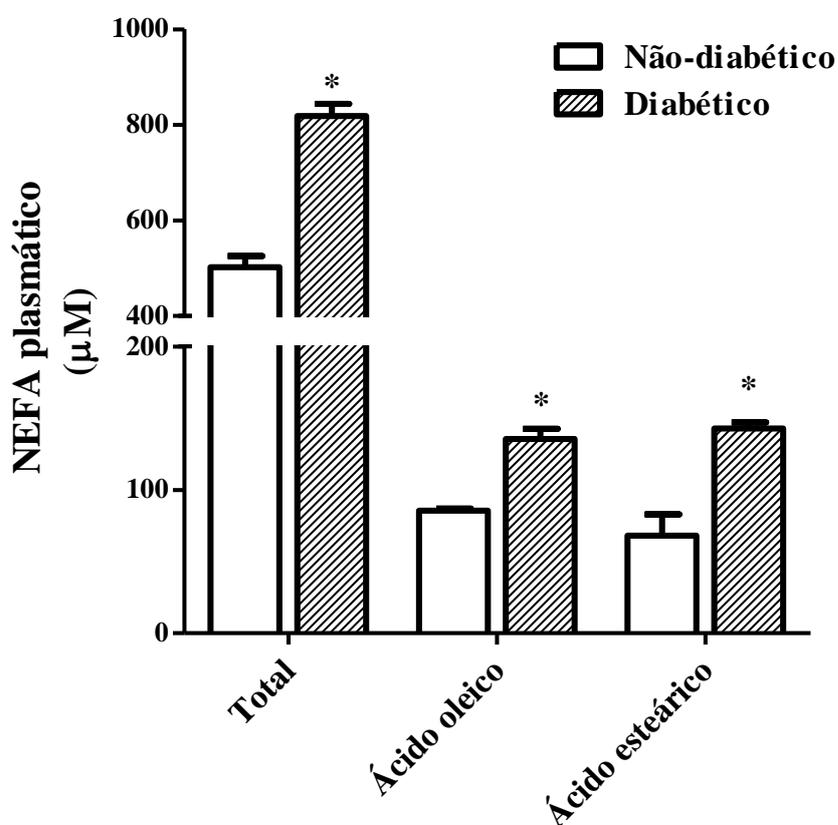


FIGURA 5.4.1: QUANTIFICAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS NÃO-ESTERIFICADOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS. O gráfico representa níveis circulantes de ácidos graxos não-esterificados totais, assim como, ácido oleico e ácido esteárico, em animais diabéticos comparados aos animais não-diabéticos. As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 5 animais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético

5.5 Ativação de TLR4 nas glândulas que compõem o eixo HPA de animais diabéticos pode estar associada com a translocação bacteriana presente na microbiota intestinal

Sabendo que alguns componentes da microbiota intestinal possuem em sua parede celular o LPS, e que este é um clássico ativador de TLR4. Decidimos observar se poderia estar acontecendo algum tipo de translocação bacteriana em nosso modelo de DM e, se a mesma estaria envolvida com a hiperatividade do eixo HPA observada nestes animais. Sendo assim, foi utilizado um coquetel de antibióticos de amplo espectro (metronidazol, neomicina e ampicilina), que em conjunto apresentaram atividade antibacteriana tanto em bactérias gram-positivas e gram-negativas quanto em organismos aeróbicos e anaeróbicos. Utilizamos este coquetel com o intuito de induzir um modelo animal “*germ-free like*”, conforme descrito por Carvalho, B.M (59). Sendo assim, foram analisados os parâmetros de glicemia (Figura 5.5.1A), peso corporal (Figura 5.5.1B), insulina plasmática (Figura 5.5.2), corticosterona plasmática (Figura 5.5.3A), hipertrofia da adrenal (Figura 5.5.3B) e, por fim, permeabilidade intestinal (Figura 5.5.4).

Animais diabéticos apresentaram hiperglicemia, associada com redução de peso corporal, hipoinsulinemia, hipercorticoidismo, hipertrofia da adrenal e aumento da permeabilidade intestinal quando comparado a animais não-diabéticos. O tratamento com coquetel de antibióticos não foi capaz de reverter os parâmetros de glicemia, peso corporal, insulina plasmática e hipertrofia da adrenal observada em animais diabéticos não-tratados. Porém, o tratamento com coquetel de antibióticos em animais diabéticos reduziu os níveis plasmáticos de corticosterona e permeabilidade intestinal observadas em animais diabéticos não-tratados. Por fim, o tratamento com antibióticos diminuiu o peso corporal, assim como aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona e hipertrofia da adrenal em animais controles quando comparado a animais não-diabéticos não-tratados.

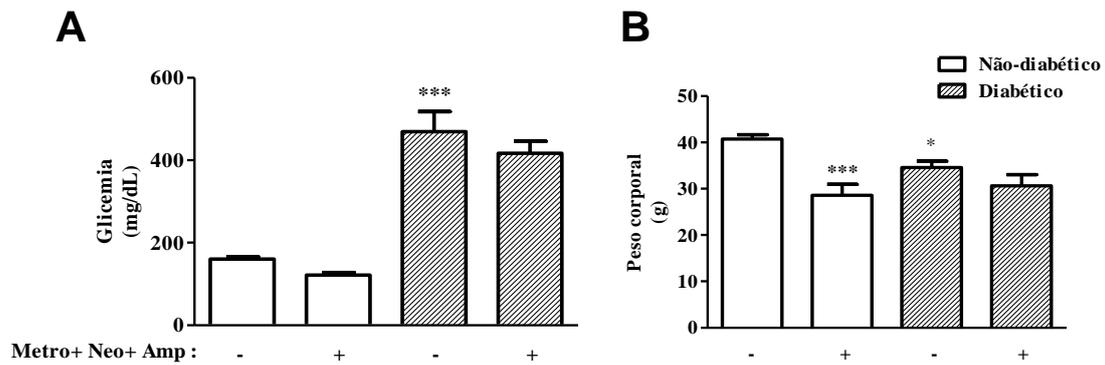


FIGURA 5.5.1: EFEITO DO COQUETEL DE ANTIBIÓTICO SOBRE O NÍVEL GLICÊMICO E PESO CORPORAL DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. O gráfico representa valores séricos de glicose (A) e peso corporal (B) de animais diabéticos tratados com coquetel de antibiótico (Metronidazole 1g/L, Neomicina 1g/L e Ampicilina 1g/L). Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (água de beber). As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 7 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado.

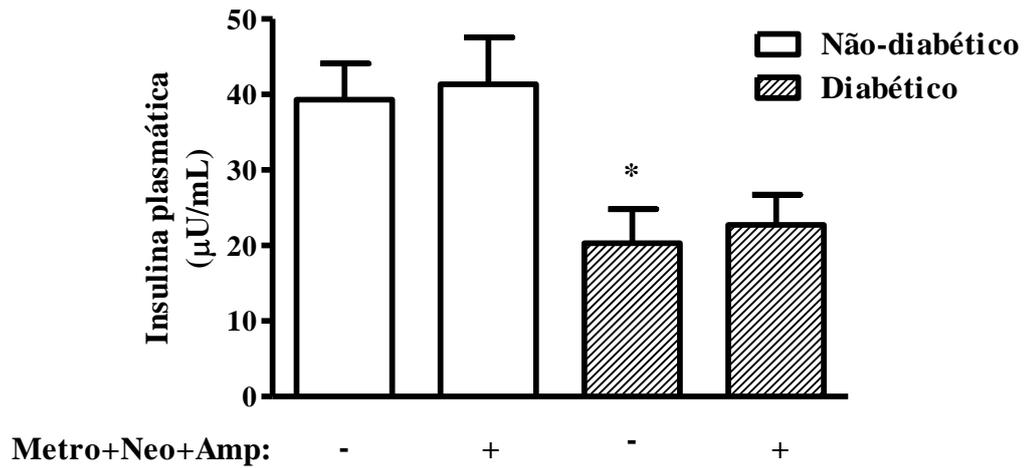


FIGURA 5.5.2: EFEITO DO COQUETEL DE ANTIBIÓTIICO SOBRE A INSULINA PLASMÁTICA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. O gráfico representa valores séricos de insulina de animais diabéticos tratados com coquetel de antibiótico (Metronidazole 1g/L, Neomicina 1g/L e Ampicilina 1g/L). Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (água de beber). As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 6 animais. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado.

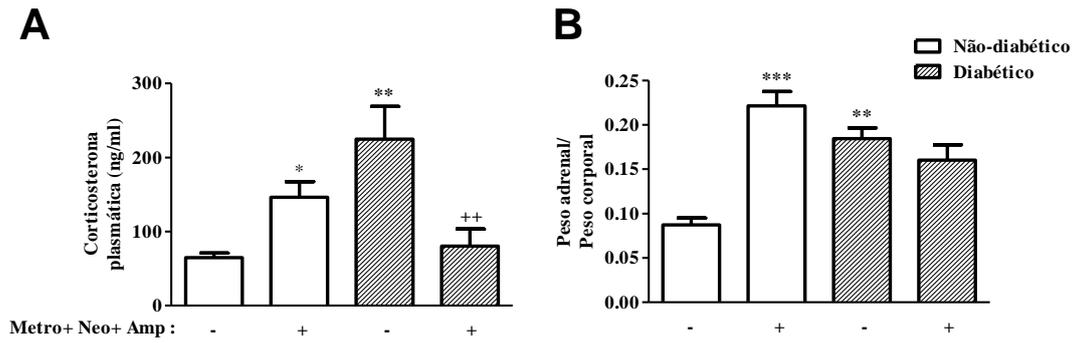


FIGURA 5.5.3: EFEITO DO COQUETEL DE ANTIBIÓTICO SOBRE O NÍVEL PLASMÁTICO DE CORTICOSTERONA E PESO DA ADRENAL DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. O gráfico representa valores séricos de corticosterona (A) e peso da adrenal (B) de animais diabéticos tratados com coquetel de antibiótico (Metronidazole 1g/L, Neomicina 1g/L e Ampicilina 1g/L), respectivamente. Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (água de beber). As barras representam média de \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 4 animais. *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo não-diabético não-tratado. ++ $p < 0,01$ em comparação ao grupo diabético não tratado.

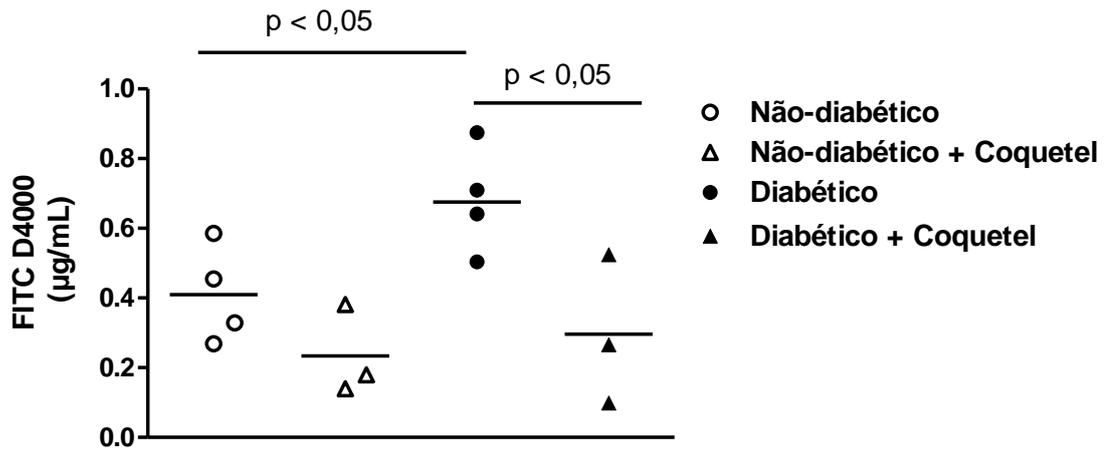


FIGURA 5.5.4: EFEITO DO COQUETEL DE ANTIBIÓTICO SOBRE A PERMEABILIDADE INTESTINAL DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS. O gráfico representa valores séricos de FITCD4000 de animais diabéticos tratados com coquetel de antibiótico (Metronidazole 1g/L, Neomicina 1g/L e Ampicilina 1g/L), respectivamente. Os animais não tratados receberam a mesma dose do veículo (água de beber).

6 DISCUSSÃO

A hiperglicemia crônica não controlada leva a hiperatividade do eixo HPA em pacientes diabéticos, porém os mecanismos para esse fenômeno são desconhecidos (62). Dados anteriores do grupo demonstraram uma relação entre a redução da expressão de PPAR γ na hipófise e na adrenal e a hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos (24). Tendo em vista que macrófagos estimulados com LPS apresentam uma redução da expressão do PPAR γ e que pacientes diabéticos apresentam um aumento na expressão do TLR4 em monócitos (32, 37, 63), o objetivo dessa dissertação foi avaliar o papel do TLR4 na hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos. Nossos dados demonstraram uma hiperexpressão do TLR4 nas glândulas hipófise e adrenal de animais diabéticos. Em adição, observamos que tanto o antagonista do TLR4, TAK-242, quanto animais mutantes para TLR4 apresentaram níveis circulantes de corticosterona similares aos de animais não-diabéticos. Observamos, ainda, que o estímulo com LPS induziu aumento nos níveis circulantes de corticosterona em animais diabéticos após 1h, situação na qual animais diabéticos não apresentaram aumento dos níveis endógenos deste glicocorticoide. Além disso, conseguimos observar que animais diabéticos apresentaram um aumento dos níveis circulantes de ativadores endógenos de TLR4, sendo estes, o ácido oleico e esteárico. Após utilizarmos um modelo de animais *germ-free* “like”, ou seja, tratados com antibióticos de amplo espectro, observamos que animais tratados com o coquetel de antibióticos tiveram os níveis circulantes de corticosterona diminuídos. Por fim, observamos que animais diabéticos apresentaram uma maior permeabilidade intestinal que foi inibida em animais diabéticos *germ free* “like”. Em suma, conseguimos concluir que TLR4 parece ser importante para a hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos.

Tendo em vista que um dos modelos para o estudo de DM 1 é através da administração intravenosa de aloxana, nossos resultados estão condizentes com as manifestações clínicas da doença. Ou seja, ratos apresentaram o quadro de hiperglicemia e hipoinsulinemia após a administração de aloxana, além de redução significativa no peso corporal. Isto se dá devido à deficiência insulínica, o que acarreta a não percepção celular da glicose, sendo necessário então o recrutamento de macromoléculas como lipídeos e proteínas, para satisfazer a cascata de obtenção de energia (64). Além disso, o modelo estabelecido foi capaz de reproduzir a hiperatividade do eixo HPA, observada em indivíduos diabéticos em situação de hiperglicemia não-controlada. O próximo passo foi tentar elucidar os mecanismos

envolvidos na desregulação endócrina do eixo HPA em tal enfermidade, haja vista que, os mecanismos para essa desregulação não são compreendidos.

Dados anteriores do Laboratório de Inflamação mostraram que animais diabéticos apresentaram diminuição na expressão de PPAR γ . Observamos, ainda, que essa redução na expressão de PPAR γ estava associada à hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos, uma vez que ao ser tratados com agonista de PPAR γ , a rosiglitazona, os animais diabéticos foram capazes de aumentar a expressão de PPAR γ na hipófise e na adrenal, além de promover a diminuição nos níveis séricos de corticosterona plasmática (24). Além disso, o tratamento com antagonista de PPAR γ GW9662 impediu o efeito da rosiglitazona de reduzir os níveis circulantes de corticosterona em animais diabéticos (65). Tentando elucidar as vias de sinalização que poderiam ser impactadas com a menor expressão de PPAR γ , resolvemos avaliar o papel do TLR4 na hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos. A justificativa para este racional foi que a ativação de PPAR γ induz redução na expressão do TLR4 em monócitos (66), com isso, formulamos a hipótese que animais diabéticos poderiam apresentar níveis elevados do TLR4 nas glândulas hipófise e adrenal. Nós observamos que ratos Wistar diabéticos apresentaram um aumento significativo na expressão de TLR4 nas glândulas hipófise e adrenal. Esse dado confirma que tanto a adrenal quanto a hipófise expressam TLR4. Uma maior expressão do TLR4 foi demonstrada anteriormente em monócitos de pacientes diabéticos, mas é a primeira vez que se observa em glândulas que compõem o eixo HPA. A hiperexpressão do TLR4 nas glândulas hipófise e adrenal de animais diabéticos é muito interessante, uma vez que pacientes diabéticos possuem aumento dos níveis circulantes de padrões moleculares associados a dano (DAMPs) capazes de ativar este receptor inflamatório como, por exemplo, HGMB1 e Hps60 (67-69). Além disso, camundongos estimulados LPS apresentaram aumento nos níveis circulantes de corticosterona (37, 70, 71).

A fim de confirmar se a diminuição da expressão de PPAR γ nas glândulas hipófise e adrenal de animais diabéticos observada por nós anteriormente (28) de fato poderia ter relação com o aumento da expressão de TLR4, avaliamos se a ativação de PPAR γ com rosiglitazona poderia interferir com a expressão do TLR4. Conforme observado anteriormente, animais diabéticos que não receberam tratamento apresentaram aumento na expressão de TLR4 na adrenal e hipófise. . O tratamento de animais diabéticos com rosiglitazona culminou em uma diminuição significativa na expressão de TLR4 em ambas as glândulas, sugerindo que a baixa expressão de PPAR γ é importante na hiperexpressão do TLR4 nas glândulas adrenal e hipófise de animais diabéticos. Os dados supracitados estão de acordo aos observados por Li-

Li Zhang *et al* onde a rosiglitazona foi capaz de promover a diminuição da expressão de TLR4 em células vasculares de músculo liso (72). Em adição, em um modelo de lesão pulmonar aguda induzido pela administração de LPS, o terpinen-4-ol, foi capaz de prevenir as lesões causadas pelo LPS através do aumento da expressão de PPAR γ e diminuição da ativação da via do NF κ B (73). Podemos especular que essa relação inversa entre PPAR γ e TLR4 pode ser entendida como uma forma de regulação da homeostase do eixo HPA. Isto é, pelas características anti-inflamatórias atribuídas ao PPAR γ , com sua ativação há a regulação da inflamação, e por consequência, leva a uma atenuação na expressão de fatores pro-inflamatórios, caso do TLR4. O raciocínio pode se dar de forma inversa, ou seja, ao ser ativado, o TLR4 pode inibir a expressão de fatores anti-inflamatórios como PPAR γ , porém mais estudos são necessários a fim de se elucidar esta hipótese. Ao analisarmos o grupo não-diabético tratado com rosiglitazona, podemos constatar um aumento significativo na expressão de TLR4 em relação ao grupo controle. Esse dado não pode ser explicado facilmente, portanto precisa de mais experimentos a fim de elucidar essa questão.

O TLR4 está envolvido em funções imunológicas a fim de gerar mediadores que possam montar uma resposta ao patógeno. Porém, esse receptor tem sido cada vez mais estudado e reportado em outras funções que não só com o viés imunológico, como por exemplo, o TLR4 tem sido apontado como um importante fator no desenvolvimento da aterosclerose (29). Além disso, a ativação do TLR4 em processos infecciosos tem uma íntima relação com a ativação do eixo HPA, isto é, sabe-se que citocinas pró-inflamatórias produzidas por células ativadas através do TLR4 podem ativar o eixo HPA, e por consequência produzir aumento nos níveis circulantes de glicocorticoide. Outro viés observado é o efeito direto da ativação do TLR4 pelo LPS em células da adrenal, culminando em produção de corticoide (74, 75). Sendo assim, o próximo passo do nosso trabalho foi entender se o aumento da expressão do TLR4 observado nas glândulas que compõem o eixo HPA de animais diabéticos pode ser responsável pela manutenção da alta produção de glicocorticoide.

Para tal, utilizamos camundongos mutantes para TLR4 (C3He.J). Os animais foram submetidos ao modelo de DM por aloxana. Podemos observar que foi possível à instauração do modelo de DM, ou seja, houve um aumento significativo dos níveis glicêmicos, comparado aos grupos controle, além da acentuada queda de peso corporal e insulina plasmática. Em seguida, analisamos a quantificação de corticosterona plasmática de animais mutantes para TLR4. Vale ressaltar que a camundongos mutantes naturais para TLR4, C3H.HeJ, conseguem expressar este receptor, porém, sua sinalização é precária, sendo

necessário uma maior concentração do estímulo a fim de se observar os mesmos efeitos encontrados na cepa controle (76). Animais selvagens diabéticos apresentam aumento significativo dos níveis circulantes de glicocorticoide, corroborando os dados até aqui apresentados. Porém, quando analisamos animais diabéticos mutantes, não há diferença significativa entre os níveis circulantes de corticosterona comparados aos camundongos não-diabéticos selvagens. A partir desses dados, foi possível sugerir a participação do receptor TLR4 na hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos. Haja vista que, ao utilizarmos o modelo animal que apresentava deficiência na sinalização de TLR4, os mesmos não apresentaram níveis aumentados de glicocorticoide circulante após a indução da DM.

Vale ressaltar que a intensa produção de glicocorticoide pela glândula adrenal em animais diabéticos gera um enorme recrutamento de todo o aparato celular, como por exemplo, o aumento da produção de enzimas esteroidogênicas. Sendo assim, como resultado macroscópico, é possível constatar uma hipertrofia desta glândula. Os animais diabéticos mutantes para TLR4 não apresentaram hipertrofia da adrenal, ao passo que animais diabéticos que não possuíam a mutação, desenvolveram o quadro de hipertrofia. Esse dado está alinhado com o dado anterior, uma vez que, animais diabéticos que portavam a mutação para o receptor TLR4 não apresentaram o quadro de hipercorticoidismo. Portanto, não havendo necessidade de maior recrutamento de aparato celular, o quadro de hipertrofia da glândula adrenal não foi observado.

A fim de consolidar a participação do TLR4 na hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos, utilizamos de outra ferramenta metodológica. Ao lançar mão do uso do antagonista do TLR4, TAK-242, observamos os mesmos dados obtidos com animais mutantes para TLR4. Isto é, animais diabéticos apresentaram uma hiperglicemia crônica, uma acentuada redução do peso corporal e níveis plasmáticos de insulina, não sendo revertidos com o uso do TAK-242. Ao analisarmos, a hiperatividade do eixo HPA, animais diabéticos ao serem tratados com o antagonista do TLR4 apresentaram uma redução nos níveis circulantes de glicocorticoide. No parâmetro de hipertrofia da adrenal, tanto animais não-diabéticos tratados com TAK-242 quanto diabéticos controles apresentaram hipertrofia da glândula adrenal. Estes dados se alinham em parte aos observados previamente, uma vez que a hipertrofia da adrenal em animais diabéticos era esperada, além desse resultado se relacionar ao dado encontrado na quantificação de corticosterona plasmática. Porém, animais não-diabéticos tratados com TAK-242 apesar de não apresentarem aumento dos níveis circulantes de glicocorticoide, desenvolveram uma hipertrofia tecidual. Mais experimentos precisam ser realizados a fim de elucidar esses dados. O conjunto de dados obtidos através de duas

metodologias realizadas visando inibir a ativação do TLR4 foi capaz de demonstrar a participação deste receptor na hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos.

Ao passo que entendemos que o receptor TLR4 estava mais expresso na hipófise e adrenal de animais diabéticos, nos perguntamos se essa maior expressão de fato culminava em uma maior ativação do sistema com concomitante maior produção de glicocorticoides. Vale ressaltar que uma célula ou tecido que apresente maior quantidade de um determinado receptor não necessariamente culmina em uma maior atividade do sistema, uma vez que muitas células possuem receptores de reserva que são o resultado da alta eficiência da interação agonista-receptor (77). Ao dizermos que houve uma ativação de um conjunto maior de receptores na, entende-se que há maior transcrição gênica. Sabendo que o principal fator de transcrição desencadeado por TLR4 é o NFκB, realizamos uma imunohistoquímica na hipófise a fim de analisar sua expressão. Animais diabéticos apresentaram um aumento na expressão de NFκB na hipófise. Esse dado nos leva a pensar que há uma maior quantidade de TLR4 ativos nesta glândula, porém outros experimentos precisam ser realizados para consolidar esse conhecimento, como, por exemplo, analisar a expressão do NFκB e de seus fatores de ativação na porção citoplasmática e nuclear de lisados oriundos da hipófise e adrenal de animais diabéticos pela técnica de Western Blot. Com o intuito de nos aprofundarmos sobre os efeitos da ativação do TLR4 no eixo HPA de animais diabéticos, mantivemos ratos Wistar diabéticos até o 21º dia e, posteriormente, estes foram estimulados com LPS por diferentes intervalos de tempo. Animais não-diabéticos apresentaram um aumento tanto dos níveis circulantes de corticosterona quanto da hipertrofia da adrenal 2 horas após a estimulação com LPS. Esses dados corroboram ao observado por Martinez que mostrou que células da adrenal quando estimuladas com LPS produzem glicocorticoide (74). Além de confirmarmos esse fenômeno também em modelo *in vivo* (78, 79).

No entanto, animais diabéticos controles estimulados com LPS não apresentaram diferença significativa quanto a hipertrofia da adrenal observada no grupo diabético não-estimulado. Esse resultado pode ser explicado devido à glândula adrenal provavelmente ter recrutado toda maquinaria esteroidogênica disponível na glândula. Sendo assim, ao ser estimulado com LPS, as células presentes nas adrenais dos animais diabéticos não conseguem promover um aumento da glândula, o que reflete em um não aumento do peso tecidual.

Ao avaliarmos os níveis de corticosterona plasmática, animais não-diabéticos apresentaram um aumento desse hormônio apenas duas horas após a estimulação com LPS. Animais diabéticos apresentaram hipercorticoidismo e ao serem estimulados com LPS, apenas animais diabéticos que foram estimulados uma hora antes de serem eutanasiados

apresentaram um aumento significativo dos níveis endógenos de corticosterona em relação ao grupo diabético não-estimulado. Esses dados são muito interessantes por algumas observações: i) o eixo HPA de animais diabéticos ao ser estimulado ainda assim consegue produzir picos de glicocorticoide, apesar dos animais diabéticos produzirem altos níveis de corticosterona; ii) embora a glândula adrenal de animais diabéticos apresente hipertrofiada uma hipertrofia limitada, ela ainda consegue mobilizar aparato celular para produzir mais glicocorticoide; iii) o aumento na expressão do TLR4 nas glândulas adrenal e hipófise de animais diabéticos resulta em uma maior ativação do sistema, o que sugere que estes são mais ativos em condições de não estimulação exógena e, sugere que não se tratam de receptores de reserva. Sendo assim, podemos especular que os níveis basais de produção de glicocorticoide de animais diabéticos se tornam aumentados quando comparado a animais não-diabéticos, mas que isso não impede de animais diabéticos responderem a estímulos que visam à ativação do eixo HPA.

Até este momento, os dados demonstraram que TLR4 exerce um papel importante na hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos. O próximo passo foi analisar se os ativadores de TLR4 estão aumentados nestes animais. Isto se dá uma vez que, por mais que haja o aumento da expressão do TLR4, caso os seus ligantes endógenos estiverem reduzidos, tende-se a não ocasionar o aumento da ativação deste receptor. Portanto, sabe-se que alguns ácidos graxos não esterificados são agonistas endógenos de TLR4, incluindo os ácidos oleico e esteárico (80, 81). Neste trabalho, observamos que animais diabéticos apresentaram aumento significativo de níveis circulantes dos ácidos oleico e esteárico. Esse dado se consolida a dados encontrados na literatura, uma vez que foi relatado o aumento de DAMPs ativadores do TLR4 circulantes em modelo murino de DM (68, 69).

Em paralelo aos dados apresentados que avaliaram a quantificação de ácidos graxos endógenos ativadores do TLR4, nosso grupo se perguntou se ativadores do TLR4 presentes na microbiota intestinal também poderiam estar contribuindo para a ativação do TLR4 nas glândulas que compõem o eixo HPA de animais diabéticos. Sabe-se que a modulação da microbiota através do tratamento com coquetel de antibióticos reduz a resistência à insulina de animais alimentados com dieta hiperlipídica. O mecanismo envolvido com a sensibilização a insulina está relacionado ao aumento da fosforilação de proteínas da cascata de sinalização deste hormônio associado à inibição da ativação de TLR4 (59). A partir disso, utilizamos o protocolo de tratamento dos autores com coquetel de antibióticos que gerou camundongos *germ free "like"* para tentar elucidar se a microbiota poderia interferir com a hiperatividade do eixo HPA no nosso modelo de DM. Os resultados obtidos demonstraram que

camundongos diabéticos que receberam o coquetel de antibióticos, ainda assim, apresentavam hiperglicemia quando comparados aos animais não-diabéticos, assim como a perda do peso corporal. Quando observamos camundongos não-diabéticos tratados com coquetel, há uma queda no peso corporal e insulina plasmática quando comparado ao grupo não-diabético não-tratado. Esse dado pode ser explicado devido à microbiota ser importante para metabolização de macromoléculas assim como para a absorção de nutrientes, gerando um quadro de estresse metabólico nos animais tratados com coquetel de antibióticos (82).

Em seguida, foi analisado o parâmetro de corticosterona circulante. Podemos observar que animais diabéticos tratados com coquetel de antibióticos apresentaram uma queda significativa nos níveis de corticosterona circulantes quando comparado aos animais diabéticos não-tratados. Com isso, é um indício que a microbiota poderia estar induzindo a hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos (83). Por sua vez, animais não-diabéticos tratados com o coquetel apresentaram um aumento significativo dos níveis de glicocorticoide, corroborando dados literários onde animais *germ-free* apresentam hiperatividade do eixo HPA culminado no aumento de glicocorticoide (84, 85). Esse dado pode ser explicado, mais uma vez, devido à microbiota auxiliar na obtenção de alguns nutrientes através da fermentação de macromoléculas (82). Com isso, a falta de percepção de alguns nutrientes poderia estar gerando um estresse no organismo e, portanto, levando a um aumento da produção do hormônio “estressor”, o glicocorticoide. Haja vista que o glicocorticoide tem várias funções metabólicas como lipólise, gliconeogênese e sensibilização de insulina, este hormônio poderia promover o recrutamento de nutrientes, a fim de balancear a situação adversa (86). Porém, outros experimentos precisam ser realizados para entendermos melhor essa dinâmica, como a quantificação de insulina.

Animais não-diabéticos tratados apresentaram aumento nos níveis circulantes de glicocorticoide, corroborando ao dado obtido no parâmetro de hipertrofia da adrenal, onde estes camundongos apresentaram o aumento significativo da glândula. Além disso, animais diabéticos não-tratados apresentaram aumento da adrenal e nos níveis de glicocorticoide. Por fim, camundongos diabéticos tratados, apesar de apresentarem diminuição nos níveis de glicocorticoide não apresentaram uma diminuição significativa no parâmetro de hipertrofia da adrenal. Esse resultado é discutível, visto que, os animais diabéticos foram tratados 7 dias após a administração de aloxana. Portanto, pode ter havido a hipertrofia nesse período e o antibiótico não foi capaz de alterar esse cenário. Em suma, os dados do experimento com coquetel de antibiótico sugerem o papel da microbiota na hiperatividade do eixo HPA em camundongos diabéticos.

Tendo em vista que a microbiota presente no lúmen intestinal é uma fonte de LPS, conhecido agonista do TLR4, o próximo passo do nosso trabalho foi observar se a permeabilidade intestinal dos animais diabéticos se encontrava alterada. O epitélio intestinal é a porta de entrada de LPS presente na microbiota para circulação sistêmica (87). Alguns estudos relatam que uma pequena quantidade de LPS oriundo da microbiota pode ser translocada através do epitélio intestinal e alcançar a corrente sanguínea (88). Em nosso modelo, notamos que animais diabéticos apresentaram aumento da permeabilidade intestinal. Porém, ao tratarmos os animais diabéticos com coquetel de antibióticos, havia reversão desse fenômeno. Logo, poderíamos supor que com o aumento da permeabilidade intestinal nos animais diabéticos, haveria a possibilidade de um aumento na translocação de LPS chegando até corrente sanguínea. Foi observado recentemente que animais tratados com dieta hipercalórica possuíam mudanças na composição da microbiota e, isso era o suficiente para ocorrer aumento na permeabilidade intestinal, sendo revertida quando os animais eram tratados com antibiótico de amplo espectro. O aumento da permeabilidade ocorria através da diminuição de proteínas presentes na junção celular intestinal (89). Possivelmente, o coquetel utilizado por nós poderia estar modulando a microbiota de algumas maneiras, sendo elas, i) através da diminuição das populações bacterianas presentes na microbiota; ii) pela redução de uma determinada família de bactérias; iii) ao favorecer a perpetuação de uma família específica de bactérias.

Sabe-se que níveis mínimos de LPS podem circular no sangue em animais saudáveis através do tecido intestinal, e que, animais com síndrome metabólica e pacientes diabéticos apresentam esses níveis aumentados (89, 90). Sendo a barreira intestinal um importante filtro na passagem de substâncias presentes no lúmen intestinal, caso haja um aumento de sua permeabilidade, poderia haver assim, um aumento de LPS circulante no sangue nesse modelo de estudo. Por sua vez, caso isso se confirme, com o aumento dos níveis de LPS circulantes e dos ativadores endógenos de TLR4, haveria a possibilidade de uma maior ativação celular da hipófise e adrenal, o que resulta em uma maior hiperatividade do eixo HPA na DM. Porém, para que isso se confirme, é preciso realizar a quantificação de níveis circulantes de endotoxinas.

7 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, observamos que há um aumento da expressão de TLR4 tanto na hipófise quanto na adrenal dos animais diabéticos. A ativação de PPAR γ leva uma diminuição de TLR4, sendo estabelecida uma relação entre a ativação/expressão destes dois fatores, PPAR γ e TLR4. Além disso, podemos observar que há um aumento nos ativadores endógenos de TLR4, ácido oleico e esteárico, em animais diabéticos, DAMPs esses que podem ser uma possível fonte de ativadores de TLR4. E por fim, animais diabéticos apresentam uma maior permeabilidade intestinal, o que parece induzir uma maior translocação bactéria para a circulação. Ademais, a microbiota parece estar envolvida na hiperatividade do eixo HPA observada em animais diabéticos como fonte de LPS, conhecido ativador de TLR4 (Figura 7.1). Em geral, podemos concluir que o receptor TLR4 é importante na hiperatividade do eixo HPA em animais diabéticos.

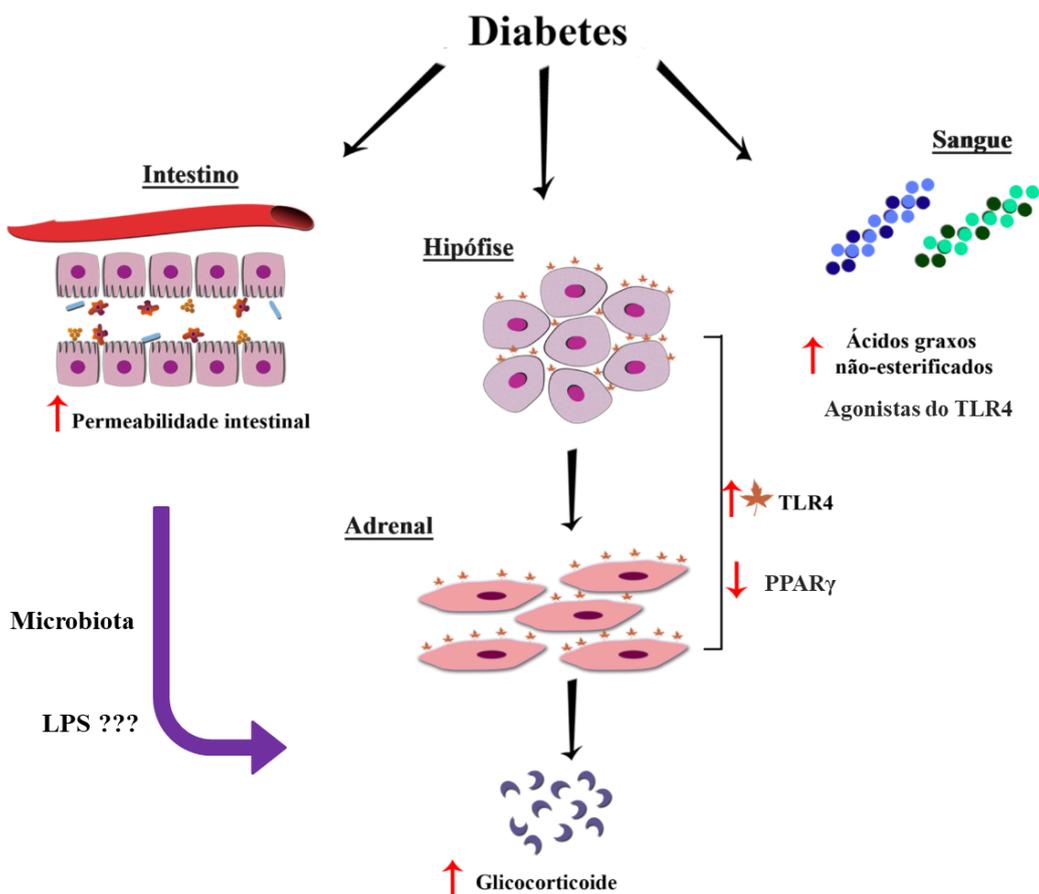


Figura 7.1 IMAGEM ESQUEMÁTICA DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS. Indivíduos diabéticos apresentaram aumento da expressão de TLR4, além da diminuição da expressão de PPAR γ , na hipófise e adrenal associado ao aumento dos níveis de glicocorticoide. Por outro lado, observa-se aumento nos níveis plasmáticos de ativadores de TLR4, ácido oleico e esteárico. Por fim, o aumento da permeabilidade intestinal em indivíduos diabéticos está associado a microbiota intestinal levando a pensar que poderia estar havendo o aumento da passagem de LPS para corrente sanguínea. Portanto, o aumento de ativadores endógenos e exógenos pode estar alimentando a ativação de TLR4 no eixo HPA, culminando no hipercorticoidismo.

8 BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13-S27.
2. IDF Diabetes Atlas 2017. 8º edição ed. International Diabetes Federation 2017.
3. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. José Egídio Paulo de Oliveira RMMJ, Sérgio Vencio, editor. Editora Clannad 2017.
4. Kruljac I, Cacic M, Cacic P, Ostojic V, Stefanovic M, Sikic A, et al. Diabetic ketosis during hyperglycemic crisis is associated with decreased all-cause mortality in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2017;55(1):139-43.
5. Rosa MQM, Rosa RDS, Correia MG, Araujo DV, Bahia LR, Toscano CM. Disease and Economic Burden of Hospitalizations Attributable to Diabetes Mellitus and Its Complications: A Nationwide Study in Brazil. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(2).
6. Petersmann A, Nauck M, Muller-Wieland D, Kerner W, Muller UA, Landgraf R, et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2018;126(7):406-10.
7. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46:419-25.
8. Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2001;45:219-27.
9. Pereira LO, Francischi RPD, Lancha Jr. AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2003;47:111-27.
10. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Koulajian K, Lewis GF. Is Insulin Action in the Brain Relevant in Regulating Blood Glucose in Humans? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(7):2525-31.
11. Ioannou K. Diabetic nephropathy: is it always there? Assumptions, weaknesses and pitfalls in the diagnosis. *Hormones*. 2017;16(4):351-61.
12. NASCIMENTO RTL, LOPES CB, COTTA DDS, DE ALENCAR NLOR, VALADÃO AF, DA MOTTA PG. NEUROPATIA DIABÉTICA DOLOROSA -

ASPECTOS CLÍNICOS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO: UMA REVISÃO DE LITERATURA. REVISTA UNINGÁ. 2018;43(1).

13. Mazziotti G, Gazzaruso C, Giustina A. Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2011;22(12):499-506.
14. Katsuyama T, Sada KE, Namba S, Watanabe H, Katsuyama E, Yamanari T, et al. Risk factors for the development of glucocorticoid-induced diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 2015;108(2):273-9.
15. Ceccato F, Boscaro M. Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension*. 2016;23(3):209-15.
16. Spiga F, Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. HPA axis-rhythms. *Comprehensive Physiology*. 2014;4(3):1273-98.
17. DeMorrow S. Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4).
18. Spiga F, Lightman SL. Dynamics of adrenal glucocorticoid steroidogenesis in health and disease. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;408:227-34.
19. Beaudry JL, Riddell MC. Effects of glucocorticoids and exercise on pancreatic beta-cell function and diabetes development. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2012;28(7):560-73.
20. Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism: clinical and experimental*. 2011;60(11):1500-10.
21. Giordano R, Guaraldi F, Berardelli R, Karamouzis I, D'Angelo V, Marinazzo E, et al. Glucose metabolism in patients with subclinical Cushing's syndrome. *Endocrine*. 2012;41(3):415-23.
22. Yuen KC, Chong LE, Riddle MC. Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2013;30(6):651-63.
23. Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology*. 2001;142(11):4872-9.
24. Torres RC, Magalhaes NS, PM ES, Martins MA, Carvalho VF. Activation of PPAR-gamma reduces HPA axis activity in diabetic rats by up-regulating PI3K expression. *Experimental and molecular pathology*. 2016;101(2):290-301.

25. Panchapakesan U, Pollock C. The role of toll-like receptors in diabetic kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2018;27(1):30-4.
26. Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Pparg): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2007;51:526-33.
27. Grygiel-Gorniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutrition journal*. 2014;13:17.
28. Necela BM, Su W, Thompson EA. Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and nuclear factor-kappaB in macrophages. *Immunology*. 2008;125(3):344-58.
29. Cao XJ, Zhang MJ, Zhang LL, Yu K, Xiang Y, Ding X, et al. TLR4 mediates high-fat diet induced physiological changes in mice via attenuating PPARgamma/ABCG1 signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018.
30. Li H, Jiao Y, Xie M. Paeoniflorin Ameliorates Atherosclerosis by Suppressing TLR4-Mediated NF-kappaB Activation. *Inflammation*. 2017;40(6):2042-51.
31. Jovanovic Stojanov S, Martinovic V, Bogojevic D, Poznanovic G, Petrovic A, Ivanovic-Matic S, et al. Modulation of diabetes-related liver injury by the HMGB1/TLR4 inflammatory pathway. *Journal of physiology and biochemistry*. 2018;74(2):345-58.
32. Devaraj S, Dasu MR, Park SH, Jialal I. Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(8):1665-8.
33. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2010;33(4):861-8.
34. Sepehri Z, Kiani Z, Nasiri AA, Mashhadi MA, Javadian F, Haghghi A, et al. Human Toll like receptor 4 gene expression of PBMCs in diabetes mellitus type 2 patients. *Cellular and molecular biology*. 2015;61(3):92-5.
35. Vivot K, Langlois A, Bietiger W, Dal S, Seyfritz E, Pinget M, et al. Pro-inflammatory and pro-oxidant status of pancreatic islet in vitro is controlled by TLR-4 and HO-1 pathways. *PloS one*. 2014;9(10):e107656.
36. Lee SM, Choi SE, Lee JH, Lee JJ, Jung IR, Lee SJ, et al. Involvement of the TLR4 (Toll-like receptor4) signaling pathway in palmitate-induced INS-1 beta cell death. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;354(1-2):207-17.

37. Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Rettori V. Adrenal gland responses to lipopolysaccharide after stress and ethanol administration in male rats. *Stress*. 2011;14(2):216-26.
38. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373-84.
39. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*. 2014;5:461.
40. Cochet F, Peri F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(11).
41. Huang NQ, Jin H, Zhou SY, Shi JS, Jin F. TLR4 is a link between diabetes and Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*. 2017;316:234-44.
42. Sartorius T, Lutz SZ, Hoene M, Waak J, Peter A, Weigert C, et al. Toll-like receptors 2 and 4 impair insulin-mediated brain activity by interleukin-6 and osteopontin and alter sleep architecture. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(5):1799-809.
43. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(8):1986-98.
44. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2017;81(4).
45. Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*. 2018.
46. Bibbo S, Dore MP, Pes GM, Delitala G, Delitala AP. Is there a role for gut microbiota in type 1 diabetes pathogenesis? *Annals of medicine*. 2017;49(1):11-22.
47. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*. 2012;336(6080):489-93.
48. Sprockett D, Fukami T, Relman DA. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2018;15(4):197-205.
49. Cerda B, Perez M, Perez-Santiago JD, Tornero-Aguilera JF, Gonzalez-Soltero R, Larrosa M. Gut Microbiota Modification: Another Piece in the Puzzle of the Benefits of Physical Exercise in Health? *Frontiers in physiology*. 2016;7:51.

50. Pascale A, Marchesi N, Marelli C, Coppola A, Luzi L, Govoni S, et al. Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*. 2018.
51. Paun A, Danska JS. Modulation of type 1 and type 2 diabetes risk by the intestinal microbiome. *Pediatric diabetes*. 2016;17(7):469-77.
52. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(44):15718-23.
53. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
54. Gulden E, Chao C, Tai N, Pearson JA, Peng J, Majewska-Szczepanik M, et al. TRIF deficiency protects non-obese diabetic mice from type 1 diabetes by modulating the gut microbiota and dendritic cells. *Journal of autoimmunity*. 2018.
55. Burrows MP, Volchkov P, Kobayashi KS, Chervonsky AV. Microbiota regulates type 1 diabetes through Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(32):9973-7.
56. de Weerth C. Do bacteria shape our development? Crosstalk between intestinal microbiota and HPA axis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2017;83:458-71.
57. De Palma G, Blennerhassett P, Lu J, Deng Y, Park AJ, Green W, et al. Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature communications*. 2015;6:7735.
58. Wang YL, Wang K, Yu SJ, Li Q, Li N, Lin PY, et al. Association of the TLR4 signaling pathway in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2015;253(3):389-98.
59. Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DML, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*. 2012;55(10):2823-34.
60. Liu Y, Chen F, Li Q, Odle J, Lin X, Zhu H, et al. Fish oil alleviates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis associated with inhibition of TLR4 and NOD signaling pathways in weaned piglets after a lipopolysaccharide challenge. *The Journal of nutrition*. 2013;143(11):1799-807.
61. Volynets V, Reichold A, Bardos G, Rings A, Bleich A, Bischoff SC. Assessment of the Intestinal Barrier with Five Different Permeability Tests in Healthy C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Digestive diseases and sciences*. 2016;61(3):737-46.

62. Prpic-Krizevac I, Canecki-Varzic S, Bilic-Curcic I. Hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with type 2 diabetes and relations with insulin resistance and chronic complications. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2012;124(11-12):403-11.
63. Kong F, Laryea G, Liu Z, Bhattacharyya S. Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 resistance limits glucocorticoid responsiveness to Toll-like receptor 4-mediated inflammation. *Immunology*. 2015;145(1):136-49.
64. Katsarou A, Gudbjornsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17016.
65. Torres RC, Batista MM, Pons AH, Silva AR, Cordeiro RS, Martins MA, et al. Activation of PPARgamma by restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats by reducing the systemic glucocorticoid levels. *European journal of pharmacology*. 2012;691(1-3):261-7.
66. Wang CZ, Zhang Y, Li XD, Hu Y, Fang ZG, Lin DJ, et al. PPARgamma agonist suppresses TLR4 expression and TNF-alpha production in LPS stimulated monocyte leukemia cells. *Cell biochemistry and biophysics*. 2011;60(3):167-72.
67. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(2):578-83.
68. Wang Y, Zhong J, Zhang X, Liu Z, Yang Y, Gong Q, et al. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Journal of diabetes research*. 2016;2016:2543268.
69. Yuan J, Dunn P, Martinus RD. Detection of Hsp60 in saliva and serum from type 2 diabetic and non-diabetic control subjects. *Cell stress & chaperones*. 2011;16(6):689-93.
70. Kong F, Laryea G, Liu Z, Bhattacharyya S. Transforming growth factor- β -activated kinase 1 resistance limits glucocorticoid responsiveness to Toll-like receptor 4-mediated inflammation. *Immunology*. 2015;145(1):136-49.
71. Vakharia K, Hinson JP. Lipopolysaccharide directly stimulates cortisol secretion by human adrenal cells by a cyclooxygenase-dependent mechanism. *Endocrinology*. 2005;146(3):1398-402.
72. Zhang LL, Gao CY, Fang CQ, Wang YJ, Gao D, Yao GE, et al. PPARgamma attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*. 2011;92(3):484-93.
73. Ning J, Xu L, Zhao Q, Zhang YY, Shen CQ. The Protective Effects of Terpinen-4-ol on LPS-Induced Acute Lung Injury via Activating PPAR-gamma. *Inflammation*. 2018.

74. Martinez Calejman C, Astort F, Di Gruccio JM, Repetto EM, Mercau M, Giordanino E, et al. Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NFkappaB-dependent mechanism involving COX-2 activation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;337(1-2):1-6.
75. Annane D. The Role of ACTH and Corticosteroids for Sepsis and Septic Shock: An Update. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:70.
76. Ogawa T, Asai Y, Makimura Y, Tamai R. Chemical structure and immunobiological activity of Porphyromonas gingivalis lipid A. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:3795-812.
77. Zhu BT. The competitive and noncompetitive antagonism of receptor-mediated drug actions in the presence of spare receptors. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 1993;29(2):85-91.
78. Kanczkowski W, Alexaki VI, Tran N, Grossklaus S, Zacharowski K, Martinez A, et al. Hypothalamo-pituitary and immune-dependent adrenal regulation during systemic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(36):14801-6.
79. Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Journal of endotoxin research*. 2003;9(1):3-24.
80. Mutoh A, Ueda S. Peroxidized unsaturated fatty acids stimulate Toll-like receptor 4 signaling in endothelial cells. *Life sciences*. 2013;92(20-21):984-92.
81. Wang S, Xiang N, Yang L, Zhu C, Zhu X, Wang L, et al. Linoleic acid and stearic acid elicit opposite effects on AgRP expression and secretion via TLR4-dependent signaling pathways in immortalized hypothalamic N38 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;471(4):566-71.
82. Lin R, Liu W, Piao M, Zhu H. A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism. *Amino acids*. 2017.
83. Bornstein SR, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Zacharowski K. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2004;36(7):470-3.
84. Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Dauge V, et al. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;42:207-17.

85. Vodicka M, Ergang P, Hrnčir T, Mikulecká A, Kvapilová P, Vagnerová K, et al. Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress. *Brain, behavior, and immunity*. 2018.
86. de Kloet AD, Herman JP. Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2018;48:50-7.
87. Guerville M, Boudry G. Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2016;311(1):G1-G15.
88. Schroeder BO, Backhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature medicine*. 2016;22(10):1079-89.
89. Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. *Endocrine reviews*. 2015;36(3):245-71.
90. Gomes JM, Costa JA, Alfenas RC. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism: clinical and experimental*. 2017;68:133-44.

9 TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO PERÍODO DO MESTRADO

1. Torres RC, **Magalhães NS**, E Silva PM, Martins MA, Carvalho VF (2016). Activation of PPAR- γ reduces HPA axis activity in diabetic rats by up-regulating PI3K expression. **Experimental and Molecular Pathology**, 101(2):290-301.
2. Daniella B.R. Insuela, Carolina T.Azevedo, Diego S. Coutinho, **Nathalia S. Magalhães**, Maximiliano R. Ferrero, Tatiana Paula T. Ferreira, Cyntia M. Cascabulho, Andrea Henriques-Pons, Priscilla C. Olsen, Patricia M.R. Silva, Renato S.B. Cordeiro, Marco A. Martins and Vinicius F. Carvalho. Glucagon reduces airway hyperreactivity, inflammation, and remodeling induced by ovalbumin. Submetido em **Scientific Reports** (2018).

10 ANOTAÇÕES