RENATA ALVARES BAGAROLLI ZAMBON

"EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE E SUAS COMPLICAÇÕES EM CAMUNDONGOS *SWISS*"

CAMPINAS
2013

.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RENATA ALVARES BAGAROLLI ZAMBON

"EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE E SUAS COMPLICAÇÕES EM CAMUNDONGOS *SWISS*"

Orientador: Prof. Dr. Mario Jose Abdalla Saad

Co-orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Sara Teresinha Olalla Saad

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia Médica, área de Concentração em Medicina Experimental.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA RENATA ALVARES BAGAROLLI ZAMBON E ORIENTADA PELO PROF.DR. MARIO JOSE ABDALLA SAAD

Asssinatura do Orientador

_____

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Z146e

Zambon, Renata Alvares Bagarolli, 1984-
Efeitos da suplementação de probióticos na prevenção da obesidade e suas complicações em camundongos *Swiss* / Renata Alvares Bagarolli Zambon. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Mario Jose Abdalla Saad.
Coorientador: Sara Teresinha Olalla Saad.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Resistência à insulina. 2. Microbiota intestinal. 3. Lipopolissacarídeos. I. Saad, Mario Jose Abdalla,1956-. II. Saad, Sara Teresinha Olalla,1956-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of probiotics supplementation on the prevention of obesity and its complications in Swiss mice
Palavras-chave em inglês:
Insulin resistance
Gut microbiota
Lipopolysaccharides
Área de concentração: Medicina Experimental
Titulação: Doutora em Fisiopatologia Médica
Banca examinadora:
Mario Jose Abdalla Saad [Orientador]
Antonio Carlos Boschero
Marcos Antonio Tambascia
Sérgio Atala Dib
Lilia Zago Ferreira dos Santos
Data de defesa: 21-05-2013
Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RENATA ALVARES BAGAROLLI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIO JOSE ABDALLA SAAD

MEMBROS:

1. **PROF(A). DR(A). MARIO JOSE ABDALLA SAAD** _____
2. **PROF(A). DR(A). ANTONIO CARLOS BOSCHERO** _____
3. **PROF(A). DR(A). MARCOS ANTONIO TAMBASCIA** _____
4. **PROF(A).DR(A). LILIA ZAGO FERREIRA DOS SANTOS** _____
5. **PROF(A).DR(A). SÉRGIO ATALA DIB** _____

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 21 de maio de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Moacir Bagarolli Filho e Denise Álvares Bagarolli, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência. Ao meu marido, Eduardo Pires Zambon, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Junto dele, passei os momentos mais felizes de minha vida.

Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

Ao Prof Mario Saad, meus irrestritos agradecimentos. Desde o inicio de nossa trajetória juntos, ele me ensinou muitos dos aspectos da vida acadêmica com entusiasmo e dedicação. A sua forma crítica, otimista, criativa e ao mesmo tempo descontraída de argüir as idéias apresentadas, sempre em busca de meu crescimento e da evolução do trabalho. Pela oportunidade de ter conhecido alguém que aliou sua mente brilhante ao seu espírito nobre. Por suas lições de **humildade** e **conhecimento** científico, enfatizando, através de seus atos, a importância de ambos substantivos andarem sempre juntos.

À Prof[a] Sara Saad, pelo seu exemplo profissional; por ter me acolhido carinhosamente em seu laboratório, um ambiente fecundo e próspero, onde pessoas que gostam de estudar e valorizam o trabalho podem encontrar seu espaço.

À Prof[a] Lilia Zago, por ter me mostrado desde a graduação, com seu prazer em lecionar, a importância de amar o que escolhemos como profissão; por ter me apresentado a vida acadêmica de forma tão encantadora.

À Prof[a] Semíramis Álvares Martins Domene, que desde o meu primeiro ano da graduação me encantou com a Nutrição e me despertou para o olhar crítico.

À minha grande amiga e parceira de bancada (e para todas as horas), Natalia Tobar. Sua amizade sincera, sua disponibilidade, além de sua parceria e companheirismo nos momentos mais difíceis deste trabalho, que me deram força para seguir em frente. Aos nossos momentos de alegria e descontração, que foram muitos, e que tenho boas recordações.

A todos meus amigos e amigas do laboratório, por serem os grandes responsáveis pelo ambiente agradável de trabalho, pelos risos, pelas interessantes discussões, pela ajuda e apoio, pela convivência rica que me fez crescer em muitos aspectos. Agradeço especialmente aos amigos Maria Carolina, Gustavo, Adriana, Dioze, Bruno, Alexandre e Guilherme.

Aos funcionários dos laboratórios do Prof Mario e da Profª Sara: Sr Luiz, Sr Jósimo, Lena, Simone e Dioze, meus sinceros agradecimentos pela convivência agradável e pela boa vontade em me ajudar, sempre!

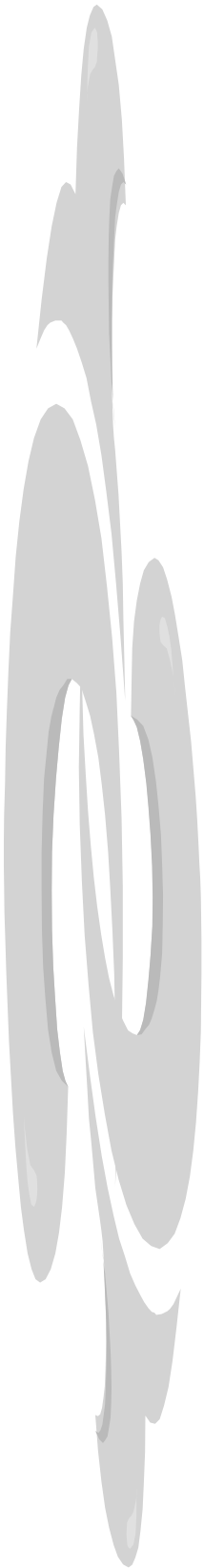
Aos proprietários da farmácia de manipulação Ao Pharmaceutico, Keka e Luís, e à farmacêutica Alexandra por terem gentilmente doado amostras dos probióticos para a execução deste trabalho.

Ao meu irmão, Fabrício Álvares Bagarolli, pela perseverança e bondade que me inspiram diariamente. Pelos momentos bons que passamos juntos.

À minha avó Leda Borges, que despertou em mim, desde a infância, o desejo pelo conhecimento e o amor pelos estudos. Que me ensinou também que o prazer deve estar nas coisas simples que a vida nos proporciona.

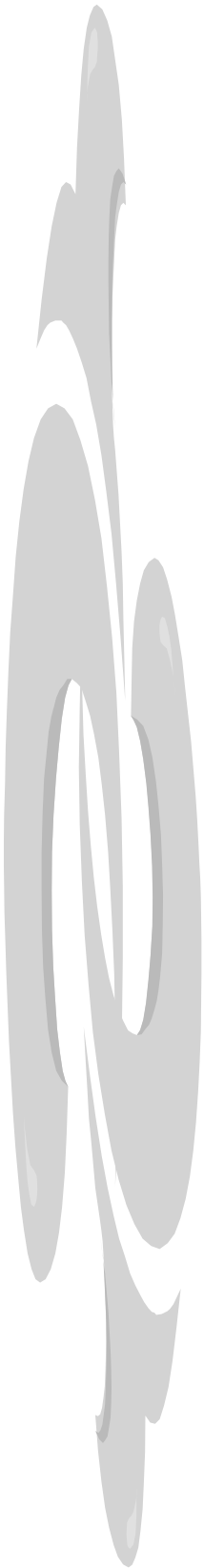
Aos meus avós paternos (Therezinha Bagarolli e Moacir Bagarolli – *in memorian*), por serem os exemplos mais vivos em minha mente de que tudo é possível quando trabalhamos bravamente e no caminho do bem.

A todos meus familiares pelos momentos bons e "terapêuticos" que passamos juntos, e que foram essenciais nos períodos difíceis que passei ao longo desses quatro anos.



RESUMO

A obesidade é caracterizada por processo inflamatório crônico e resistência à insulina (RI), os quais são responsáveis por grande parte de suas doenças associadas. Sabe-se que diversas moléculas do sistema imune inato estão associadas à RI e obesidade, destacando-se o receptor toll-like-receptor 4 (TLR4). Sua via de sinalização está ativada na obesidade, devido à presença aumentada na circulação de seu principal ligante, lipopolissacarídeo (LPS). Acredita-se que esta endotoxemia metabólica seja causada por alterações na microbiota e na permeabilidade intestinais, o que torna o intestino e as bactérias que o habitam, grandes alvos para o tratamento da obesidade. O objetivo deste presente trabalho foi avaliar os efeitos dos probióticos (PB) na sensibilidade à insulina e na sinalização de TLR4 em tecidos insulino-sensíveis, além de verificar suas possíveis ações na microbiota intestinal. Dessa forma, camundongos *Swiss* foram divididos em 4 grupos: controles (C), controles tratados com PB (C+PB), obesos (DIO) e obesos tratados com PB (DIO+PB). O tratamento teve a duração de 5 semanas. O uso de PB em animais obesos proporcionou grandes melhoras nos parâmetros fisiológicos e moleculares de RI, além de atenuar a ativação da via de sinalização do TLR4, provavelmente pela redução dos níveis circulantes de LPS. O grupo DIO+PB ainda mostrou mudanças positivas na distribuição dos filos de bactérias intestinais e menor permeabilidade intestinal, quando comparado com o grupo DIO. Analisando o hipotálamo, observou-se que o uso de PB nesse modelo de obesidade regulou de forma favorável os mecanismos centrais de controle da fome, bem como alguns parâmetros de inflamação. Assim, conclui-se que a regulação da microbiota intestinal promovida pela administração de probióticos pode trazer benefícios no controle da obesidade, por reduzir ou atenuar mecanismos moleculares de resistência à insulina.



ABSTRACT

Obesity is the main risk factor to the development of insulin resistance and type 2 diabetes. The common basis among these events is an inflammatory process characterized by the activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by its main ligand lipopolysaccharide, LPS. Its concentration is higher in obese people and it is believed that changes in composition of the gut microbiota and epithelial functions may play a role in the inflammation associated with obesity. The aim of the study was to evaluate the effects of probiotic on the insulin sensitivity, TLR4 signaling, intestinal permeability and microbiota composition in diet-induced obese mice. Male adult *Swiss* mice composed randomly 2 groups: chow diet (CTL) and high-fat diet by 5 consecutive weeks (DIO). During these 5 weeks, some mice of the DIO and CTL groups received daily a pool of probiotics. The DIO animals that received probiotic presented an expressive improvement in their glucose tolerance test, fasting glucose and in parallel a significant increase in the phosphorylation levels of insulin induced IR, IRS1 and Akt in muscle, liver and adipose tissue. There was a relevant reduction in the TLR4-Myd88 interaction, IKKβ and JNK phosphorylation and iNOS expression in DIO mice treated with probiotic. This treatment also improved the expression of ileal tight-junctions proteins (ZO-1, Occludin), decreased LPS portal levels and the concentrations of bacteria of the phylum *Firmicutes* (associated with obesity) in feces. Analyzing the hypothalamus, it was observed that the use of probiotics in this model of obesity favorably regulated central mechanisms of food intake, as well as some inflammation parameters. In conclusion, our results show that probiotics, through their effects on intestinal permeability and microbiota composition, can improve insulin sensitivity and signaling of DIO mice, reducing their inflammation and suggesting potential beneficial effects in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. LPS, TLR4 e Resistência à Insulina 33

Figura 2. Trato gastro-intestinal: funções principais e prevalência de bactérias 35

Quadro 1. Principais filos presentes na microbiota intestinal e suas características 36

Figura 3. Mecanismos que ligam a disbiose intestinal a distúrbios metabólicos .. 43

Figura 4. Mecanismos de ação dos probióticos 46

Tabela 1. Ingredientes e Composição Nutricional entre a dieta padrão AIN93G e a dieta modificada hiperlipídica aplicada em nosso laboratório 52

Tabela 2. Seqüências de Primers de camundongos para PCR Real-Time quantitativo 58

Figura 5. Confecção de PCRs com seqüências específicas para identificação e seqüenciamento dos amplicons 61

Figura 6. Parâmetros fisiológicos e metabólicos de camundongos controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas, obesos e obesos tratados com probióticos por 5 semanas 67

Figura 7. Teste de tolerância à glicose (TTG) realizado em camundongos controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas, obesos e obesos tratados com probióticos por 5 semanas 68

Figura 8. Efeitos da administração de probióticos na via de sinalização da insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica e controles 70

Figura 9. Efeitos da administração de probióticos na ativação do TLR4 e nas principais proteínas de sua sinalização em camundongos controles e DIO 72

Figura 10. Níveis teciduais de mRNA de IL-1β, IL-6 e TNF-α e níveis séricos de IL-6 e TNF-α em animais controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas, obesos e obesos tratados com probióticos por 5 semanas 74

Figura 11. Análise metagenômica da prevalência e distribuição de filos da microbiota intestinal de camundongos controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas, obesos e obesos tratados com probióticos por 5 semanas 76

Figura 12. Efeitos da administração de probióticos na expressão de proteínas de *tight-junctions* e nas modulações metabólica e imunológica do intestino (íleo) 79

Figura 13. Caracterização morfológica de amostras de fígado 81

Figura 14. Caracterização morfológica de amostras de tecido adiposo epididimal 82

Figura 15. Efeito do uso de probióticos nas vias de sinalização hipotalâmicas de leptina e insulina e no controle da ingestão alimentar 85

Figura 16. Efeitos dos probióticos nas principais proteínas da via de sinalização TLR4 e nos níveis de mRNA de TLR4 e citocinas inflamatórias no hipotálamo 86

Figura 17. Mecanismo proposto pelo qual os probióticos melhoram a homeostasia da glicose e resistência à insulina 97

ACC – Acetil CoA carboxilase

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

AGL – Ácidos graxos livres

Akt – Proteína quinase B

AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) – Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

AP-1 (*activator protein 1*) – Proteína ativadora 1

Cbl – Produto do proto oncogene Cbl

CD14 (*cluster of differentiation 14*) – Cluster de diferenciação 14

ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*) – Proteína ligadora do elemento responsivo ao carboidrato

DAMP (*damage-associated molecular patterns*) – Padrões moleculares associados a danos

DIO (*diet-induced obesity*) – Obesidade induzida por dieta

ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*)

FAS (*fatty acid synthase*) – Ácido graxo sintase

Fiaf (*fasting induced adipose factor*) – Fator adipocitário induzido pelo jejum

FOXO-1 (*Forkhead box protein O1*)

Gab-1 (*GRB2-associated-binding protein 1*) – Proteína ligadora 1 associada à GRB-2

GLUT 4 (*Glucose Transporter 4*) – Transporador de Glicose 4

GLP-1/2 (*Glucagon-like peptide 1 and 2*) – Peptídeo semelhante ao glucagon 1 e 2

GPR-41 e 43 (G protein-coupled receptors 41 and 43) – Receptores de ácidos graxos de cadeia curta

GSK-3 (*Glycogen synthase kinase 3*) – glicogênio sintase quinase 3

IB – Immunoblot

ICV – Intracerebroventricular

IP – Intraperitoneal

IKK β – IκB quinase β

IκBα – Inibidor kappa B α

IL-1β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IMC – Índice de Massa Corpórea

iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*) – Oxido Nítrico Sintase Induzível

IR (*Insulin Receptor*) – Receptor de Insulina

IRAK (*Interleukin -1 Receptor-associated Kinase*) – Quinase associada ao receptor de interleucina 1

IRS 1/2 (*Insulin Receptor Substrate 1/2*) – Substratos 1 e 2 do receptor de insulina

JNK – c-jun N-terminal quinase

LPL – Lipoproteína lipase

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) – Proteína quimioatrativa de monócitos 1

MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*)

mTOR *(mammalian target of rapamycin)*

NF-kB (*Nuclear Factor kappa B*) – Fator de transcrição kappa B

NO – Óxido Nítrico

NOD-1 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1*)

NPY – Neuropeptídeo Y

p – Fosforilado

PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*) – Inibidor do ativador de plasminogênio 1

PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) – Padrões moleculares associados a patógenos

PCR (*polimerase chain reaction*) – Reação em cadeia da polimerase

PCR – proteína C reativa

PDK-1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) – Proteína quinase 1 dependente de fosfatidilinositol 3

PI 3K – Fosfatidilinositol 3 quinase

PKC – Proteína quinase C

PKR – proteína quinase dependente de RNA de fita dupla

POMC – pro-opiomelanocortina

PRR (*pattern recognition receptor*) – Receptor de reconhecimento de padrões

PTP 1B (*Protein Tyrosine Phosphatase 1 B*) – Proteína Tirosina Fosfatase 1 B

PYY – Peptídeo YY

QM – Quilomicron

RI – Resistência à insulina

SAA – Proteína amilóide sérica A

Ser307 – Resíduo Serina 307, presente na proteína IRS-1

SerP – Fosforilação em Serina

SH2 (*Src Homology 2*) – Domínios protéicos com homologia ao proto ancogene Src2

Shc (*Src Homologys and Colagen Homology*)

SREBP (*sterol regulatory element binding protein*) – Proteína ligadora do elemento regulatório de esterol

TA – Tecido adiposo

TAG – Triacilglicerol

TAK (*transforming growth factor kinase*)

TGI – trato gastrintestinal

TIR (*Toll-Interleukin 1 receptor*) – Receptor toll-interleucina 1

TIRAP (*Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein*)

TLR4 (*Toll like receptor 4*) – Receptor toll like 4

TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*) – Fator de Necrose Tumoral α

TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor number six*)

TTG – Teste de tolerância à glicose

UFC – Unidade Formadora de Colônia

VLDL (*very low density lipoprotein*) – Lipoproteína de densidade muito baixa

ZO-1 – Zonula-Occludens 1

SUMÁRIO

PÁG.

1. INTRODUÇÃO 20

1.1 Obesidade: uma epidemia mundial 21

1.2 Bases fisiopatológicas da obesidade 23

1.3 Tecido adiposo, inflamação e obesidade 25

1.4 Mecanismos moleculares de resistência à insulina 27

1.4.1 A via de sinalização da insulina 27

1.4.2 Proteínas intracelulares associadas à resistência à insulina 28

1.4.3 TLR4: importante receptor do sistema imune inato que conecta diversas vias moleculares de resistência à insulina 30

1.5 Microbiota intestinal e obesidade 33

1.5.1 Conhecendo o intestino e os microrganismos que o habitam 33

1.5.2 Ações metabólicas da microbiota e sua relação com a obesidade 37

1.5.3 Probióticos: uma alternativa para o tratamento da obesidade? 44

2. OBJETIVOS 47

3. MATERIAIS E MÉTODOS 49

3.1 Materiais 50

3.2 Animais 50

3.3 Tratamento com probióticos 52

3.4 Níveis sanguíneos de citocinas, insulina e glicose 53

3.5 Níveis Portais de LPS 53

3.6 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal 53

3.7 Clamp Euglicêmico-Hiperinsulinemico 54

3.8 Extração de Tecidos 54

3.9 Preparo de Proteínas e Análise de Western Blots 55

3.9.1 Imunoprecipitação (MyD88/TLR4) 55

3.9.2 Western blots 56

3.10 Extração de RNA e PCR *Real Time* 57

3.10.1 Extração de RNA total 57

3.10.2 Transcrição Reversa 57

3.10.3 Reação de PCR *Real Time* 57

3.11 Histologia e Imunohistoquímica 59

3.12 Metagenômica 60

3.12.1 Extração de DNA 60

3.12.2 Montagem das bibliotecas 60

3.12.3 Análise dos resultados 62

3.13 Sinalização de insulina e leptina no hipotálamo 62

3.13.1 Canulação Intracerebroventricular 62

3.13.2 Injeção intracerebroventricular de insulina 63

3.13.3 Injeção intraperitoneal de leptina 63

3.13.3 Determinação de Ingestão Alimentar 64

3.14 Analise Estatística 64

4. RESULTADOS 65

4.1 Parâmetros fisiológicos e metabólicos 66

4.2 Efeitos da suplementação de probióticos na via de sinalização da insulina em tecidos insulino-sensíveis 69

4.3 Efeitos da suplementação de probióticos na via de sinalização TLR4 em tecidos insulino-sensíveis 71

4.4 Efeitos da suplementação de probióticos nos níveis teciduais e circulantes de citocinas inflamatórias 73

4.5 Efeitos do tratamento com probióticos na microbiota intestinal 75

4.6 Efeitos do uso de probióticos na modulação da expressão de proteínas e mRNA envolvidos com os equilíbrios metabólico e imunológico do íleo 77

4.7 Efeitos do tratamento com probióticos nas histologias de fígado e tecido adiposo e na infiltração de macrófagos no tecido adiposo 80

4.8 Efeitos do tratamento com probioticos no controle da ingestão energética e na inflamação do hipotálamo 83

5. DISCUSSÃO 87

6. CONCLUSÕES 98

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 100

8. APÊNDICE 109

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade: uma epidemia mundial

A obesidade é definida, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), como o acúmulo excessivo ou anormal de gordura, que promove alterações morfológicas e fisiopatológicas, responsáveis por reduzir o tempo e a qualidade de vida. A doença é resultante de um desequilíbrio no balanço energético, caracterizado pelo aumento da ingestão energética em relação ao gasto energético (1). A sua patogenia é influenciada por elaboradas interações entre uma complexa rede de fatores, incluindo características genéticas e ambientais. Dentre os últimos fatores destacam-se o sedentarismo aliado à abundante oferta de alimentos de alta densidade energética e pobre em micronutrientes, além dos fatores comportamentais, de identidade cultural e níveis de escolaridade e socioeconômico (2).

Atualmente sabe-se que a obesidade é uma epidemia mundial e esse dado não é surpreendente para ninguém. Nas últimas duas décadas, o crescimento mundial de sobrepeso (definido como índice de massa corporal – IMC $\geq 25 kg/m^2$) e obesidade (IMC $\geq 30 kg/m^2$) aconteceu em proporções imoderadas e as projeções futuras revelam que a prevalência da doença atingirá níveis ainda mais assustadores. De acordo com a OMS, em 2008 cerca de 1,5 bilhão de adultos apresentavam sobrepeso e, destes, mais de 500 milhões eram obesos (1). Se compararmos com dados de 1980, o aumento na prevalência de obesidade foi de mais de duas vezes, e as projeções para 2030 indicam que um número próximo a 3,3 bilhões de pessoas, ou 57,8% da população adulta mundial, terá sobrepeso

ou obesidade (3). No Brasil, cerca de metade da população adulta apresenta excesso de peso, enquanto 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres apresentam obesidade (4).

Segundo dados do maior estudo multicêntrico de distribuição global de doenças (*The Global Burden of Disease Study 2010*) publicado recentemente, o IMC elevado representa hoje uma crise de saúde mundial, superando a fome, e é o fator de risco líder para o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis em alguns continentes, incluindo a América do Sul (5). As doenças mais relevantes associadas a esse acúmulo excessivo de gordura são: diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, doenças respiratórias e nas vias biliares, osteoartrite, neurodegeneração, além de alguns tipos de câncer (esôfago, vias biliares, pâncreas, rim, mama, útero, cólon e reto) (6). A obesidade também está relacionada com problemas de fertilidade (síndrome do ovário policístico e baixa contagem de espermatozóides) e diversas alterações dermatológicas (7, 8). Sendo assim, pode-se afirmar que, além do forte estigma social, a obesidade está ligada a reduzida expectativa de vida e morte prematura e, de fato, a população mundial hoje vive em países nos quais os indivíduos são mais susceptíveis de morrer pelas conseqüências do excesso de peso do que pelos fatores associados à desnutrição (9). Por estes motivos, faz-se necessário compreender as bases biológicas da obesidade e descobrir novas terapias médicas para restaurar as funções metabólicas deste crescente grupo populacional.

1.2 Bases Fisiopatológicas da Obesidade

A obesidade é acompanhada de resistência à insulina (RI), que é caracterizada pela diminuição da ação desse hormônio em seus tecidos-alvos. A evolução dessa diminuição da ação da insulina pode resultar em intolerância à glicose, que é uma situação intermediaria na evolução para o diabetes tipo 2 (10). Por isso que a obesidade é um importante fator de risco para o diabetes tipo 2, sendo que nos EUA mais de 80% dos pacientes diabéticos tipo 2 estão com sobrepeso ou obesidade (11).

A RI afeta seus principais tecidos insulino-sensíveis. Em tecido muscular há uma menor captação de glicose induzida por insulina. No fígado, há maior produção de glicose por gliconeogênese (12). No tecido adiposo, a resistência à insulina inicia-se mais tardiamente, contribuindo para os efeitos de hipertrofia adipocitária, e conseqüente desenvolvimento da obesidade (13). No hipotálamo há menores efeitos anorexigênico e termogênico deste hormônio (14). Todas essas alterações metabólicas, aliadas principalmente à hiperinsulinemia crônica, causam um grupo de efeitos sistêmicos, que vão gerar as principais complicações da obesidade.

A alteração inicial básica da obesidade e mais importante para o desenvolvimento de RI é a inflamação. Entretanto, o processo inflamatório decorrente da obesidade é diferente da inflamação clássica definida pelos sinais cardinais de rubor, calor, dor e inchaço. Em adição, essa resposta clássica está associada com taxa metabólica basal aumentada e representa a resposta rápida e focada do sistema imune à infecção. Normalmente, quando a infecção é dominada, a inflamação está resolvida (15). Porém, a resposta inflamatória encontrada na obesidade é de uma natureza diferente (16).

Primeiramente, o gatilho inflamatório na obesidade é metabólico e causado pelo excesso de consumo de nutrientes. Além disso, células metabólicas (como os adipócitos) são as células que iniciam e sustentam o processo inflamatório, mediando assim a interface entre metabolismo e inflamação. Em outras palavras, sinais que emergem de células metabólicas iniciam as respostas inflamatórias e prejudicam a homeostasia do nosso metabolismo (17). E essa interconexão entre os sistemas metabólico e imunológico fica mais evidente, quando se observa a similaridade entre adipócito (célula metabólica) e macrófago (célula imunológica). Trinta a 59% dos genes que se correlacionam com a obesidade e metabolismo dos adipócitos estão relacionados com a biologia do macrófago, sendo muitos desses genes conservados desde espécies muito primitivas até seres humanos (18). Além disso, muitos hormônios, citocinas, proteínas de sinalização, fatores de transcrição e lipídios bioativos apresentam funções tanto para o sistema metabólico como imunológico, reforçando que estes dois sistemas são interdependentes e estão proximamente ligados (17).

A história da obesidade associada à inflamação tem mais de 100 anos, com a primeira observação de que a glicemia de pacientes diabéticos tipo 2 era reduzida pelo acido acetil salicílico (AAS), um fármaco com potente ação anti-inflamatória (19). Há aproximadamente 20 anos, em 1993, níveis aumentados da citocina pró-inflamatória TNF-α (fator de necrose tumoral alfa) foram encontrados no tecido adiposo de camundongos obesos em associação com a RI, e tal achado foi um marco nessa área de pesquisa (20). A partir de então, outros mediadores inflamatórios, tais como proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1β (IL-1β), inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) também foram associados com a obesidade tanto em modelos

experimentais, como em humanos. Em adição, moléculas intracelulares envolvidas com vias de sinalização inflamatórias, como IκBα quinase β (IKKβ) e c-Jun N-terminal quinase (JNK) também foram encontradas mais expressas e ativas no tecido adiposo, músculo e fígado (21,22). É importante destacar que essa inflamação tem um caráter crônico e de baixo grau, o que são características que determinam a obesidade como uma doença inflamatória subclínica crônica, diferente das características de uma infecção, trauma, ou resposta imunológica aguda.

1.3 Tecido Adiposo, inflamação e obesidade

Um dos questionamentos clássicos a respeito da obesidade seria qual a grande fonte dessas citocinas e mediadores inflamatórios que circulam nos indivíduos e animais obesos. E essa dúvida é facilmente explicada quando se observa as características do tecido adiposo (TA) de um obeso. É nítido avaliar primeiramente o tamanho dos adipócitos; eles estão hipertrofiados em relação ao tecido de um animal/individuo magro. Essa hipertrofia vem principalmente do excesso de nutrientes que esse tecido tem que armazenar. Muitas vezes, a quantidade de macronutrientes extrapola a capacidade metabólica da célula e ela acaba desenvolvendo mecanismos de proteção, que podem gerar sua morte, por exemplo. Outras vezes, essa hipertrofia promove níveis de oxigênio subótimo às células, que passam a viver em situações de hipóxia. Todas essas alterações geram sinais intra e extra-celulares que vão culminar no recrutamento de células imunológicas ao tecido para "solucionar" este estado de alerta que os adipócitos se encontram. A molécula quimiotáxica mais importante nesse contexto é a MCP-1

(*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), responsável por atrair macrófagos para a região e iniciar o processo de inflamação no tecido (13,17). Os macrófagos secretam diversos mediadores inflamatórios, descaracterizando todo o TA, especialmente os adipócitos, que passam a secretar diversas adipocinas para a circulação, incluindo proteína amilóide sérica A (SAA), PCR, PAI-1, fibrinogênio, IL-1β, IL-6, TNF-α, entre outras, que vão contribuir (juntamente com esses macrófagos infiltrados) para o processo sistêmico de inflamação da obesidade (17). Muitas vezes, esses macrófagos se agregam em volta de adipócitos hipertrofiados, formando estruturas facilmente vistas em cortes histológicos de TA, denominadas *crown-like structures*, que indicam a gravidade e cronicidade da infiltração (23).

Questionamentos também existem em relação ao inicio dessa infiltração e ao "pico" da presença de macrófagos no TA. Estudos experimentais mostram que em 2-3 semanas de dieta hiperlipídica (uma dieta especifica para induzir obesidade e RI, com aproximadamente 45-60% de lipídios em sua composição) já se observa a expressão de genes relacionados a macrófagos no TA, com um aumento dramático em 16 semanas de dieta (24). Sendo assim, conclui-se que o desenvolvimento da inflamação é proporcional ao aumento da massa adiposa e o desenvolvimento da RI intensifica o processo inflamatório.

1.4 Mecanismos moleculares de resistência à insulina

1.4.1 A via de sinalização da insulina

Para que sejam compreendidos os mecanismos moleculares da resistência à insulina do DM2, é necessário inicialmente descrever como a insulina transmite seu sinal no meio intracelular desde seu receptor até os efetores finais.

A sinalização intracelular da insulina em tecidos insulino-sensíveis clássicos (fígado, tecido adiposo e músculo esquelético) inicia-se com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana, o receptor de insulina (IR). O IR é uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina-quinase, composta por duas subunidades α, extra-celulares, onde se localiza o sítio de ligação da insulina; e duas subunidades β, intracelulares, onde localiza-se o sítio catalítico. A ligação da insulina às subunidades α leva à mudança conformacional nas subunidades β e consequente auto-fosforilação, o que ativa sua capacidade tirosina-quinase (25).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em resíduos de tirosina, incluindo membros da família dos substratos dos receptores de insulina (IRS- 1/2/3/4), Shc, Gab-1 e Cbl. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia à Src 2 (SH2). Dentre estas, destaca-se a PI3-K (fosfatidil inositol 3 quinase). Esta proteína é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado pela insulina. A principal proteína-alvo da PI3K é a Akt (ou PKB), cuja ativação leva a captação de glicose via translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática, síntese protéica e de glicogênio. A ativação de Akt requer a proteína PDK-1,

que em combinação com uma quinase ainda não identificada, leva a fosforilação de Akt. Seus próximos alvos são GSK3, mTOR e GLUT4, que promovem a síntese de glicogênio, síntese protéica e captação de glicose, respectivamente. Sendo assim, as principais ações metabólicas da insulina têm inicio com a ativação de Akt e, por isso, essa proteína é merece destaque em estudos ligados à obesidade (26).

1.4.2 Proteínas intracelulares associadas à resistência à insulina

A resistência à insulina da obesidade é caracterizada por alterações em diversos pontos, com redução da concentração e da atividade quinase do receptor, da concentração e da fosforilação do IRS-1 e -2, da atividade da PI 3-quinase, da translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) e da atividade das enzimas intracelulares (26).

Na última década, muitos avanços ocorreram na compreensão dos eventos moleculares associados à resistência à insulina em seus tecidos-alvo clássicos (fígado, músculo e tecido adiposo), bem como em células β, cérebro e outros tecidos. Pode-se dizer que em todas as situações há o envolvimento de mediadores da inflamação (citocinas pró-inflamatórias), além de adipocinas (substâncias secretadas pelo tecido adiposo), que são responsáveis, por meio da comunicação intracelular através de seus receptores específicos, por atenuar a via de sinalização promovida pela insulina em células responsivas à sua ação. Os mecanismos moleculares de resistência à insulina são principalmente induzidos por ação de serina-quinases (JNK, IKKβ, PKC – isoformas novas: δ, θ, ε) e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (27).

Em estados de resistência à insulina, mediadores como TNF-α, IL-1β e ácidos graxos livres (AGL) levam à ativação de IKKβ, JNK e PKCs (δ, θ, ε) por meio de vias de sinalização intermediárias. Tais ativações, por sua vez, aumentam o número de resíduos de serina e treonina fosforilados no IRS-1, transformando-o em uma proteína com ação inibitória sobre o sinal de insulina. As serina-quinases (JNK, IKK, PKCs) são potentes inibidores da via de sinalização da insulina, pois o IRS-1 possui mais de cem resíduos de serina que podem ser fosforilados, incluindo os mais importantes, os resíduo de serina 307 e 312, tornando esse substrato mais refratário à associação com o receptor de insulina e, conseqüentemente, reduzindo sua fosforilação em tirosina, o que pode contribuir para a resistência à insulina durante situações de estresse fisiológico, como inflamação e obesidade (28).

Em especial, as serina-quinases JNK e IKKβ são consideradas grandes indutoras da resistência à insulina, porque além de agirem como inibidoras diretas da via de sinalização da insulina, promovem a retro-alimentação da via, por meio da ativação dos fatores de transcrição pró-inflamatórios AP-1 (*activator protein 1*) e NF-κB, respectivamente. Por exemplo, a ativação da proteína IKKβ promove a fosforilação e degradação da proteína IκB, que fica acoplada ao NF-κB, permitindo a translocação deste fator de transcrição para o núcleo, o qual irá ativar genes envolvidos na resposta inflamatória (como os genes do TNF- α, IL-1β , moléculas de adesão e outros mediadores da inflamação) (27).

O NF-κB age como um dos mais importantes fatores de transcrição na expressão gênica da oxido nítrico sintase induzível (iNOS) em diversos tipos de culturas de células (29). Há algum tempo, a iNOS foi descoberta como importante indutora de resistência à

insulina em modelos animais e em humanos (30,31). A expressão da iNOS leva a produção de considerável quantidade de NO, o que é capaz de provocar S-nitrosação e com isso modificar a função de proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica. Carvalho-Filho et al. (32) mostraram que a indução da iNOS em três modelos de resistência à insulina em ratos levou a sinalização diminuída de insulina pela via IR/IRS-1/Akt, bem como a um aumento dos níveis de S-nitrosação destas proteínas. Desta maneira, a indução da iNOS também representa um importante mecanismo molecular de resistência à insulina.

1.4.3 TLR4: importante receptor do sistema imune inato que conecta diversas vias moleculares de resistência à insulina

Conhecendo-se as principais proteínas envolvidas diretamente com a RI, alguns pesquisadores observaram que estas eram moléculas *downstream* de vias do sistema de defesa orgânico inespecífico: o **sistema imune inato**. Os PRRs são a parte primitiva do sistema imune. Eles são proteínas expressas por células do sistema imune para identificar os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), os quais estão associados a patógenos microbianos ou estresse celular, bem como DAMPs (padrões moleculares associados a danos), que estão relacionados com compostos celulares liberados durante o dano celular. Sendo assim, os PRRs marcariam o inicio dos mecanismos moleculares de RI (33).

Os PRRs mais bem descritos e relacionados à RI são os ligados à membrana da família Toll-like receptor (TLR). Esta família compreende 11 receptores, que são

altamente conservados desde espécies mais primitivas até organismos superiores como mamíferos. Essas proteínas foram originalmente descobertas em *drosophilas*, onde exerciam papel na ontogênese e também na defesa antifungos (34). Em mamíferos, o papel de destaque destes receptores é com relação a sua participação em vias do sistema imune inato. O TLR4 é o principal exemplar dessa família que conecta o sistema imune inato à RI. Ele é capaz de reconhecer principalmente fragmentos da parede de bactérias gram-negativas, como lipopolissacarídeo (LPS) (35,36).

O TLR4 está expresso em células que participam da resposta imune primária, como: macrófagos e células epiteliais, além de células de tecidos insulino-sensíveis, incluindo hepatócitos, adipócitos e células de músculo esquelético. Ele também interage com outras substâncias endógenas e exógenas, incluindo: proteínas de choque térmico, fibrinogênio, fibronectina, ácidos graxos saturados e AGL (37,38). Estes dois últimos ligantes do TLR4 têm especial relação com o mecanismo fisiopatológico da obesidade, sendo uma das principais conexões moleculares entre lipotoxicidade e resistência à insulina (37).

Após o acoplamento de ligantes específicos ao TLR4, há a ativação simultânea de diversas vias moleculares de resistência à insulina. Primeiramente, os ligantes de TLR4 são reconhecidos pelo complexo TLR4-MD-2 presente na superfície celular. Uma vez ativado, o TLR4 é submetido a oligomerização e recruta seus adaptadores *downstream* através de interações com os domínios TIR (*Toll-Interleukin 1 receptor*). Os domínios TIR contêm 3 regiões altamente conservadas que promovem interações proteína-proteína entre o TLR4 e suas proteínas adaptadoras. Uma das proteínas adaptadoras mais importantes no cenário da obesidade é a MyD88. Ela recruta e ativa IRAK-4, a qual é

responsável pelo recrutamento, ativação e degradação de IRAK-1. Outra proteína adaptadora, TRAF6, é essencial para a via dependente de MyD88 e está abaixo de IRAKs 1 e 4 (39). Ela ativa TAK, que por sua vez, ativa as serina-quinases, JNK e IKKβ. Já foi visto no item anterior que essas serina-quinases atenuam a via de sinalização da insulina, por diminuir a capacidade de fosforilação em tirosina de proteínas da via. Além disso, IKKβ ativa NF-κB, fator de transcrição que induz a expressão de proteínas envolvidas com a resposta inflamatória inespecífica, como citocinas e enzimas pró-inflamatórias, que acentuam mecanismos de RI (36,38). Dessa maneira, percebe-se que a ativação de TLR4 integra diversos mecanismos moleculares de resistência à insulina, como a ativação de JNK, IKK β e NF-kB (Fig. 1).

A descoberta de que TLR4 está envolvido na gênese da resistência à insulina reforça ainda mais o conceito de que as vias metabólicas e inflamatórias estão estreitamente interligadas e que fatores ambientais (como alta ingestão de ácidos graxos saturados e LPS de bactérias gram-negativas presentes na microbiota intestinal humana) são o gatilho para muitas doenças crônicas que possuem como principal mecanismo fisiopatológico a inflamação, como a obesidade (40).

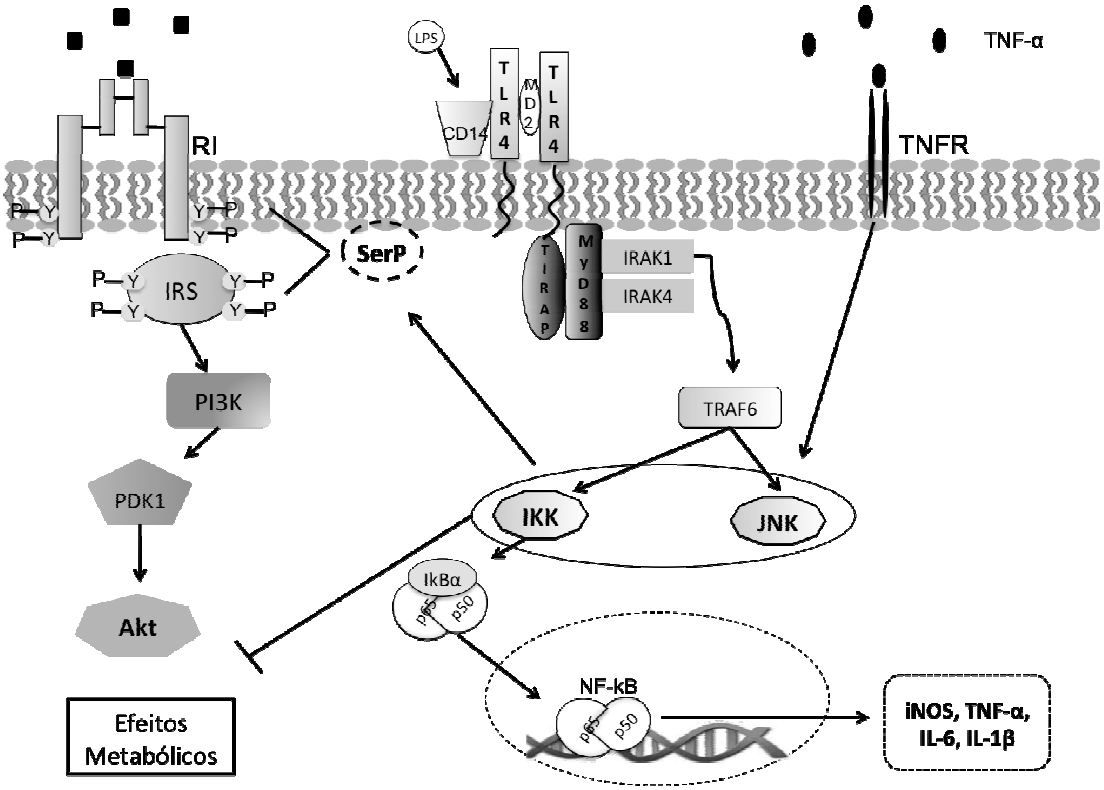


Figura 1. LPS, TLR4 e Resistência à Insulina. A via do TLR4 inicia-se com a ligação do LPS à proteína CD14. Esse complexo se liga ao dímero de TLR4 e à molécula acessória MD2. A resposta é então transduzida no complexo de sinalização do receptor IL-1 (TIRAP, MyD88). Essas proteínas adaptadoras ativam IRAK e TRAF-6, responsáveis por ativar as duas serina-treonina quinases JNK e IKK. Elas fosforilam proteínas da via da insulina (IR, IRS) em resíduos de serina e isso atenua a fosforilação em tirosina da via da insulina, gerando resistência à insulina. Além disso, IKK também ativa NF-kB, fator de transcrição que sintetiza diversas citocinas inflamatórias, como TNF-α, que faz a retroalimentação da via e acentua a Resistência à Insulina. Abreviações: Akt: proteína quinase B, CD14: *cluster of differentiation 14*, IκBα: inibidor α do NFκB, IKK: IkB quinase, IL-1β: interleucina 1β, IL-6: interleucina 6, iNOS: oxido nítrico sintase induzível, IRAK: Quinase associada ao receptor de interleucina, IRS: substrato do receptor de insulina, JNK: Jun N terminal quinase, RI: receptor de insulina, MyD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88,* NF-κB: fator nuclear κB, PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinase, SerP: fosforilação em serina, TIRAP: *Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein*, TLR4: *toll-like receptor 4*, TNF-α: fator de necrose tumoral α, TRAF6: *tumor necrosis factor receptor associated factor number six.*

1.5 Microbiota Intestinal e Obesidade

1.5.1 Conhecendo o intestino e os microrganismos que o habitam

A microbiota intestinal humana abriga principalmente bactérias, mas archaea, vírus e protozoários também estão presentes. Ela é dominada por bactérias anaeróbias, as

quais superam as bactérias aeróbias e facultativas anaeróbias em 100 a 1000 vezes. No intestino de um adulto, um total de aproximadamente 10^{14} células bacterianas estão presentes, o que representa dez vezes o número total de células do organismo humano. Seu genoma combinado (denominado de microbioma) contém mais de 5 milhões de genes, superando assim, o potencial genético do hospedeiro por duas ordens de grandeza (41). Esse grande arsenal de produtos gênicos proporciona um espectro diversificado de atividades bioquímicas e metabólicas que complementam a fisiologia do hospedeiro. Na realidade, a capacidade metabólica da microbiota intestinal se iguala à do fígado, e ela pode, portanto, ser considerada como um órgão adicional (42). Essas bactérias são essenciais para diversos aspectos da biologia do hospedeiro e desempenham diversas funções, como por exemplo: facilitam o metabolismo de carboidratos não digeríveis e produzem vitaminas; são necessárias para o desenvolvimento e diferenciação do epitélio intestinal do hospedeiro e sistema imunológico; conferem proteção contra invasão por patógenos oportunistas; e têm um papel-chave em manter a homeostasia tecidual (43).

No total, a microbiota intestinal consiste de aproximadamente 500-1000 espécies que, interessantemente, pertencem apenas a poucos filos de bactérias. De longe, os filos mais abundantes no intestino humano são Firmicutes e Bacteroidetes e as outras espécies presentes são membros dos filos Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria e Cianobacteria (44). O Quadro 1 mostra os gêneros de bactérias mais importantes presentes em cada filo, bem como algumas características importantes. Dois gradientes de distribuição microbiana podem ser encontrados no TGI. Primeiro, a densidade aumenta da porção proximal para a distal do intestino (Fig. 2) e ao longo do eixo tecido-lúmen (com poucas bactérias aderindo ao tecido ou camada de muco, mas um

grande numero presente no lúmen intestinal). Segundo, a diversidade de bactéria aumenta proporcionalmente à densidade microbiana, ou seja, onde encontra-se o maior numero de bactérias, também terá uma grande diversidade de espécies (41).

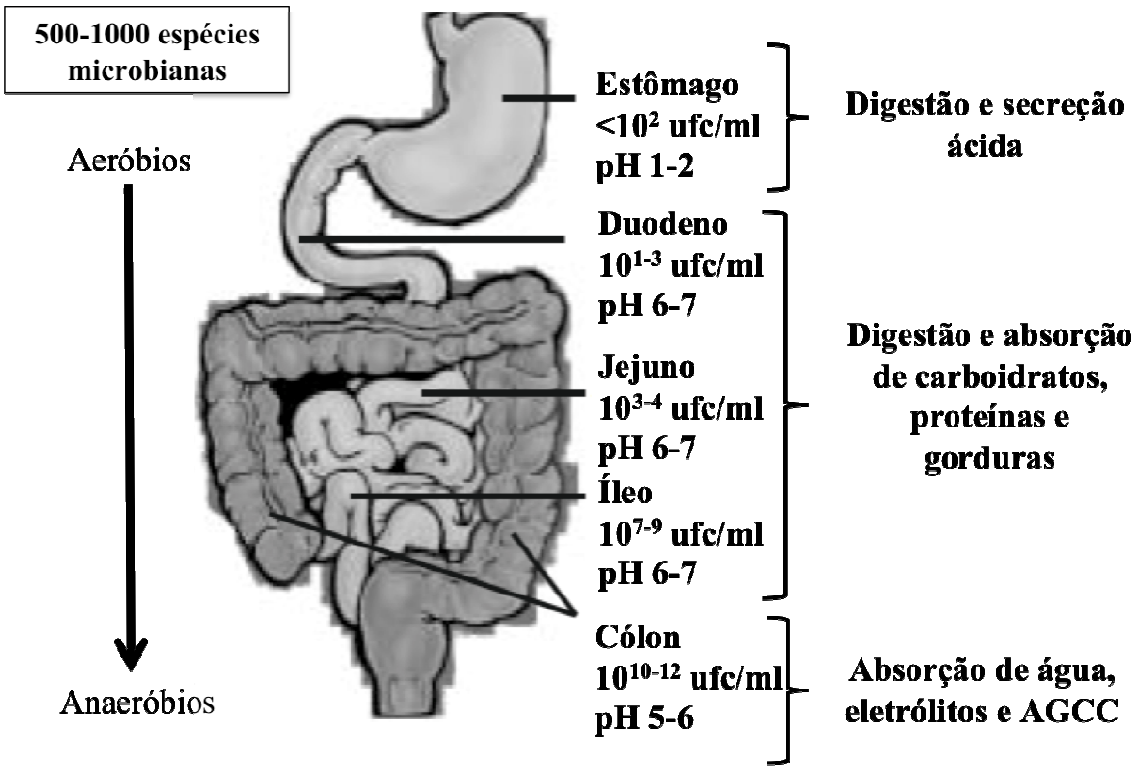


Figura 2. Trato gastro-intestinal: funções principais e prevalência de bactérias. A figura ilustra que os microrganismos intestinais prevalecem no cólon, isso pelas adequadas condições de pH e nutrientes que essa região apresenta. Também é possível observar na figura que quanto mais distal é a porção intestinal, maior a presença de microrganismos anaeróbios, com características altamente fermentativas e grande produção de subprodutos dessa fermentação. Abreviações: AGCC: ácidos graxos de cadeia curta, ufc: unidade formadora de colônia.

Quadro 1. Principais filos presentes na microbiota intestinal e suas características(44-46)

Filo	Gêneros Representativos	Características
Reino Bactérias		
Firmicutes	*Ruminococcus* *Clostridium* *Lactobacillus* *Enterococcus* *Mollicutes*	Um grande filo que compreende 274 gêneros de bactérias predominantemente gram-positivas. Compreende tanto gêneros com atividade imunomodulatória benéfica (*Clostridium, Lactobacillus*), como gêneros que induzem inflamação e que estão associados a algumas doenças crônicas (*Mollicutes*)
Bacteroidetes	*Bacteroides* *Prevotella*	Um dos filos predominantes no intestino humano e consiste principalmente de bactérias gram-negativas, com características fermentativas e que modulam o sistema imune intestinal de forma benéfica
Proteobacteria	*Escherichia* *Helicobacter* *Salmonella*	São bactérias gram-negativas com grande variedade de formatos. O filo inclui uma grande diversidade de patógenos, bem como de bactérias responsáveis por fixação de nitrogênio
Actinobactéria	*Bifidobacterium*	Consiste de bactérias gram-positivas e o seu principal gênero (ao lado) é comum no intestino humano, especialmente com o consumo de prebióticos
Cianobacteria	*Synergistes*	Também conhecidas como bactérias azuis. Apresenta efeitos pouco elucidados na microbiota intestinal
Verrucomicrobia	*Chlamydia*	Este filo apresentam bactérias com grande potencial patogênico. O gênero *Chlamydia* já foi associado com câncer
Reino Archaea		
Euryarchaeota	*Methanobrevibacter*	Esses microrganismos promovem aumento da eficiência de fermentação das bactérias, por serem grandes consumidores de H_2

A simbiose complexa que existe entre microbiota intestinal e ser humano é dependente de fatores como o ambiente e a genética do hospedeiro. A harmonia que existe entre as bactérias é garantida pelo sistema imunológico do hospedeiro, que sabe conviver pacificamente com trilhões de bactérias de forma única e intrigante e, ao mesmo tempo, mantendo-se alerta para qualquer microrganismo patogênico que possa surgir no lúmen intestinal. Essa grande habilidade da imunidade intestinal busca prevenir o desenvolvimento de disbiose intestinal e aumento de permeabilidade intestinal (do inglês "*leaky gut*"), duas situações que são inerentes uma a outra e coexistem em algumas doenças crônicas, como a obesidade. A primeira é definida como um desequilíbrio na configuração estrutural e/ou funcional da microbiota, levando a perda da homeostasia hospedeiro-microrganismos (40). A segunda acontece quando complexos juncionais - *tight junctions* - (que estão localizados entre os enterócitos e que conectam essas células, tornando o epitélio impermeável) se rompem ou tornam-se mais "frouxos" por uma redução de expressão de proteínas presentes nesse complexo (41). Essa situação permite a translocação de bactérias, fragmentos de bactérias e toxinas do lúmen intestinal para a circulação sanguínea.

1.5.2 Ações metabólicas da microbiota e sua relação com a obesidade

Atualmente, muita atenção tem sido dada para o papel da microbiota intestinal na homeostase energética e funções metabólicas do hospedeiro. Na realidade, a microbiota intestinal foi recentemente proposta como um importante fator ambiental no controle do peso corporal e da homeostase energética. Esse órgão "externo" ao corpo humano,

contribui para o nosso equilíbrio via múltiplas funções metabólicas e diversos mecanismos de controle envolvidos na extração de calorias de substâncias dietéticas ingeridas, que poderão ser posteriormente armazenadas no tecido adiposo, promovendo aumento de peso (47). Muitos dos estudos que elucidam esses mecanismos são realizados com animais *germ-free* (que são animais que apresentam uma população muito reduzida, quase nula, de microrganismos), os quais são responsáveis por essa nova maneira de entender os mecanismos fisiopatológicos da obesidade, bem como mais uma forma possível de ver como a dieta é capaz de promover RI e suas doenças correlatas. Nossos hábitos alimentares são grandes moduladores do perfil metagenômico de nossa microbiota (48).

Os estudos nessa área iniciaram-se com o pesquisador Jeffrey I. Gordon e animais *germ-free* há quase uma década. Primeiramente, ele e seus colaboradores observaram que camundongos convencionais apresentaram 42% mais gordura corporal quando comparados aos *germ-free*. Entretanto, o transplante de microbiota dos animais convencionais para os *germ-free* gerou um aumento considerável de gordura corporal e desenvolvimento de RI em 14 dias, fatos que não foram associados com diferenças no consumo ou gasto energéticos. Os autores relacionaram tais alterações com maior extração de energia da dieta, proporcionada pela presença da microbiota intestinal (49). A partir deste fato, esse e outros grupos de pesquisadores começaram a buscar mecanismos que conectam a microbiota com a homeostase energética, os quais estão descritos a seguir:

A A presença da microbiota intestinal resulta no dobro de capilares nas vilosidades intestinais do intestino delgado, ajudando a promover maior absorção intestinal de

macronutrientes (especialmente monossacarídeos) (50).

B Outro dado interessante é que a inoculação dos *germ-free* com bactérias diminui a expressão intestinal de Fiaf (*fasting-induced adipose factor ou angiopoietin-like protein 4*). Fiaf é um inibidor circulante de LPL (liproteína lipase), enzima responsável pela hidrólise de triacilgliceróis presentes em VLDL ou Quilomicrons (QM) e posterior absorção dos ácidos graxos livres (AGL) por músculo e principalmente TA. A redução da expressão de Fiaf pela presença da microbiota aumenta consideravelmente o armazenamento de ácidos graxos pelo TA e conseqüentemente proporciona ganho de peso (49).

C Camundongos *germ-free* têm atividade aumentada de AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*), pois suas células epiteliais colônicas são severamente deprivadas de energia e esta enzima é uma grande sensora do status de energia celular. AMPK estimula a oxidação de gorduras e diminui os níveis de glicogênio, ações que aumentam a sensibilidade à insulina em fígado, músculo e TA (51).

D O nosso proteoma tem um repertório muito reduzido de hidrolases glicosídicas que são necessárias para digerir polissacarídeos complexos derivados de plantas. E a nossa microbiota intestinal sintetiza um grande arsenal dessas enzimas e nos permite processar esses carboidratos complexos em monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Ambos os nutrientes podem participar da lipogênese por meio da indução da expressão de ácido graxo sintase (FAS) e acetil CoA carboxilase (ACC) no fígado. Essas enzimas têm a expressão controlada por ChREBP (ativado pela glicose) e SREBP-1 (ativado por AG) e camundongos *germ-free* quando

inoculados com bactérias apresentam as atividades desses 2 fatores de transcrição aumentadas (52).

E Os AGCC ainda agem como ligantes de receptores específicos para esses pequenos lipídeos, chamados de GPR-41 e GPR-43. Estes são receptores acoplados à proteína G e estão presentes nas células L intestinais (células enteroendócrinas). Eles atuam na prevenção da inflamação, controlam a permeabilidade intestinal e estimulam a produção de hormônios intestinais (GPR-41 está envolvido na produção de PYY e GPR-43 está envolvido na produção das incretinas GLP-1 e GLP-2) (53). Camundongos *knock-out* para GPR-43 têm adiposidade reduzida e são resistentes ao ganho de peso quando submetidos à dieta hiperlipídica (54). Mas esses efeitos "negativos" dos AGCC são discutíveis, pois eles apresentam muitas funções benéficas também. Por exemplo, o hormônio GLP-1 melhora a secreção pancreática de insulina e aumenta a saciedade via regulação hipotalâmica; já o hormônio GLP-2 tem um efeito interessante na expressão de proteínas de *tight-junctions*, diminuindo a permeabilidade intestinal (53). Por isso, as ações dos AGCC na obesidade ainda precisam ser esclarecidas (Fig. 3).

Enfim, estes foram os principais mecanismos descobertos que ilustram o papel da microbiota nas funções metabólicas do hospedeiro e fortalecem sua relação com a obesidade. Entretanto, esses estudos em camundongos *germ-free* têm apenas a finalidade de definir mecanismos, pois não há qualquer possibilidade de aplicação para seres humanos. Sendo assim, trabalhos que buscam entender quais são as diferenças entre as microbiotas de indivíduos e/ou animais obesos e magros começaram a surgir. E realmente, foi comprovado que não apenas a presença da microbiota intestinal, mas a sua

qualidade pode influenciar no conteúdo de gordura corporal do hospedeiro (55).

O primeiro trabalho que avaliou essa diferença de microbiotas, mostrou que tanto camundongos *ob/ob* como humanos obesos apresentam uma redução significativa de Bacteroidetes e um aumento proporcional de Firmicutes (55). A maior parte dos trabalhos posteriores confirmaram esse achado (56). Entretanto, outros bons trabalhos afirmam o contrário (57-59), mostrando que essa questão ainda precisa ser melhor elucidada. Camundongos *ob/ob* também apresentam mais integrantes do reino metanogênico Archaea, o qual pode aumentar a eficiência de fermentação bacteriana via remoção de H_2 (55). Este dado está em concordância com achados em humanos. Em humanos obesos há mais bactérias do gênero *Prevotella* (as quais são grandes produtoras de H_2) e do filo Firmicutes; aliado a isso, também foi encontrado maior numero de representantes do reino Archaea (60). Por outro lado, a bactéria benéfica e moduladora da atividade inflamatória intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* é mais escassa no intestino de indivíduos obesos e com diabetes tipo 2 (46).

A dieta hiperlipídica também promove grandes mudanças na microbiota intestinal de camundongos. Animais obesos alimentados com essa dieta apresentam alta quantidade de microrganismos da classe *Mollicutes* (pertencente ao filo Firmicutes), que apresentam alta expressão de β-frutosidase, uma enzima capaz de degradar carboidratos que contêm frutose, como a sacarose (61). A dieta hiperlipídica é capaz de mudar a microbiota do animal em apenas 1 dia. Ela promove aumento de Firmicutes e Proteobacteria e diminui a presença de Bacteroidetes (62,63). Em 2 semanas, ela promove translocação bacteriana em tecido adiposo e aumento dos níveis de LPS circulantes (64). Esse aumento nos níveis de LPS foi também observado em humanos obesos e com alto consumo de gordura

saturada na dieta. Nesses pacientes, há um aumento de 2-3xs nos níveis de LPS, caracterizando um estado definido como “endotoxemia metabólica” (65).

Como já visto, o LPS pode causar RI via ativação de TLR4, mas a forma como o LPS teria acesso aos TLR4s de tecidos insulino-sensíveis sempre foi uma dúvida. Por algum tempo, pensou-se que o grande protagonista dessa ativação eram os ácidos graxos saturados, que seriam provenientes tanto da dieta, como da lipotoxicidade da RI (37). Mas depois, essa teoria enfraqueceu-se quando outros trabalhos revisaram e contestaram tais resultados (66,67). Posteriormente, Cani et al. (68) demonstraram que o excesso de gordura dietética não apenas aumenta a exposição sistêmica a ácidos graxos pró-inflamatórios, mas facilita o desenvolvimento de endotoxemia metabólica (Fig. 3). O LPS torna-se aumentado no sangue nesses casos por três motivos. O primeiro seria pela maior presença desse fragmento de bactérias no intestino, visto que esses animais apresentam disbiose intestinal e atividade diminuída de fosfatase alcalina (enzima que degrada LPS); o segundo seria pela incorporação do LPS nos QM após o consumo de uma dieta rica em ácidos graxos; e o terceiro seria pelo aumento da permeabilidade intestinal na obesidade, que é resultante da diminuição da expressão de proteínas de *tight-junctions* (como ZO-1 e ocludina), aumentando a passagem de bactérias e fragmentos bacterianos como o LPS (40) (Fig. 3).

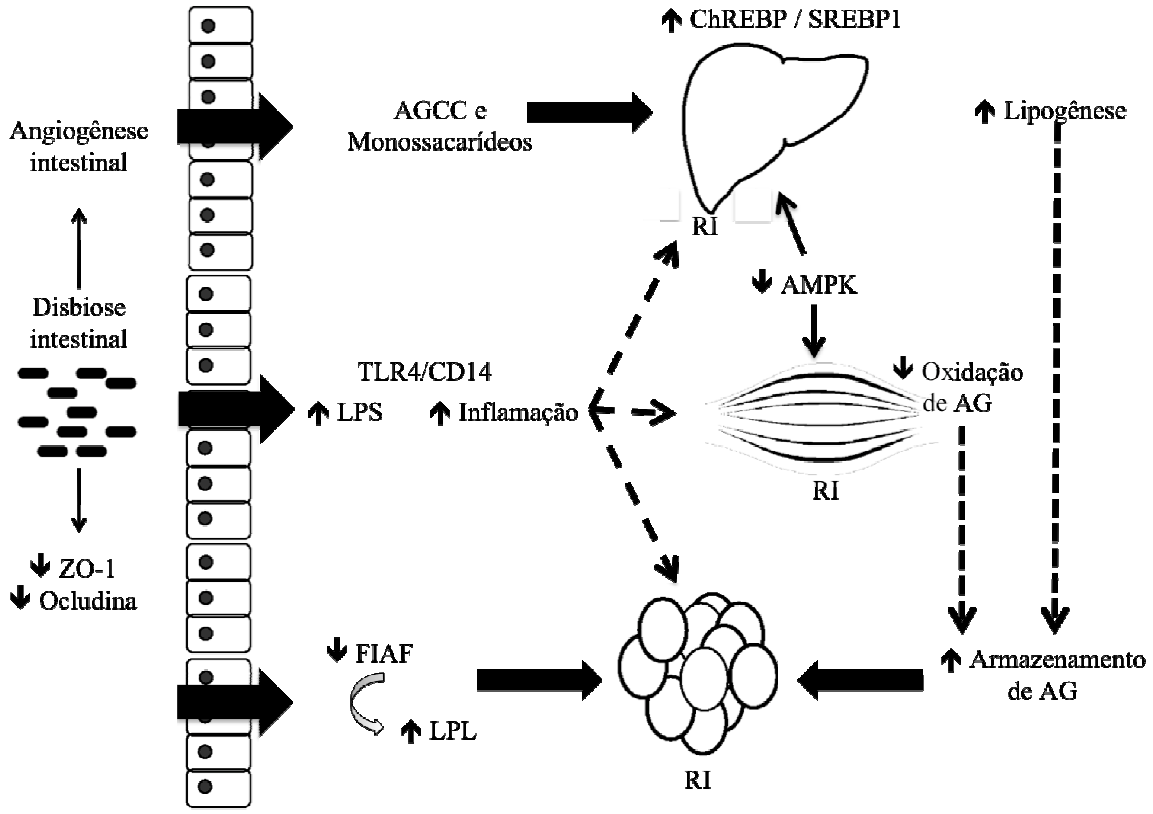


Figura 3. Mecanismos que ligam a disbiose intestinal a distúrbios metabólicos. A presença de uma microbiota obesogênica proporciona a redução da produção intestinal de Fiaf, um grande inibidor da enzima LPL, o que gera um maior armazenamento de AG no tecido adiposo. Essa microbiota também promove menor gasto energético e oxidação de AG, provavelmente via redução da expressão de AMPK. Nesse cenário, existe uma maior absorção de AGCC e monossacarídeos, o que aumenta a lipogênese hepática e facilita o desenvolvimento de RI e esteatose hepática. Além disso, a permeabilidade intestinal está aumentada nesses casos, o que incrementa a translocação de LPS para a circulação sanguínea e tecidos insulino-sensíveis e causa RI. Abreviações: AG: ácidos graxos, AGCC: ácidos graxos de cadeia curta, AMPK: *adenosinse monophosphate kinase*, CD14: *cluster of differentiation 14*, ChREBP: *carbohydrate response element binding protein*, Fiaf: *fasting-induced adipose factor*, LPL: lipoproteína lípase, LPS: lipopolissacarídeo, RI: resistência à insulina, SREBP: *sterol regulatory element binding protein*, TLR4: *toll-like receptor 4*, ZO-1: zonula-occludens 1.

Sendo assim, a endotoxemia metabólica é muito importante para determinar RI. Essa afirmação tornou-se mais clara quando em nosso laboratório observou-se que o uso de antibióticos protege contra o desenvolvimento de massa adiposa induzida pela dieta, intolerância à glicose, resistência à insulina e inflamação, sugerindo que a dieta hiperlipídica pode não ser capaz de causar obesidade diretamente (69). Entretanto, o uso de antibióticos não seria o melhor caminho para o tratamento da obesidade e RI, pois

existem trabalhos que mostram que esse tipo de tratamento pode proporcionar disbiose intestinal e o desenvolvimento de colite, doenças atópicas, alérgicas (70,71), além de aumentar um comportamento semelhante à ansiedade em camundongos saudáveis (72). Também acredita-se que os antibióticos atuais não são específicos para as populações de bactérias que são responsáveis pela obesidade, e essas ainda precisam ser determinadas para que novos antibióticos possam ser desenvolvidos. Nesse contexto, um dos suplementos alimentares que podem ser aplicados na obesidade e RI são os probióticos.

1.5.3 Probióticos: uma alternativa para o tratamento da obesidade?

Os probióticos são definidos como uma preparação ou um produto contendo microrganismos viáveis e definidos em número suficiente para alterar a microbiota em um compartimento do hospedeiro e exercer efeitos benéficos à saúde do mesmo. Os probióticos devem: ser resistentes à destruição pelo acido gástrico e bile; aderir ao tecido epitelial intestinal; ser capaz de colonizar o TGI, mesmo que por um curto período de tempo; produzir substancias anti-microbianas; modular as respostas imunes e metabólicas do hospedeiro (73). Os probióticos estão comercialmente disponíveis em muitas formas, incluindo alimentos, suplementos dietéticos e terapêuticas clinicas com administração oral ou não-oral.

A observação original de propriedades benéficas conferidas por algumas bactérias é atribuída ao ganhador do premio Nobel Eli Metchnikoff, que é considerado o pai dos probióticos modernos. No começo do século XX, Metchnikoff descobriu que bactérias saudáveis, especialmente bactérias produtoras de ácido láctico podem ter uma influencia

positiva na digestão e sistema imunológico (74). A maioria dos microrganismos reconhecidos até hoje como probióticos são bactérias gram-positivas, com os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterium* sendo as principais espécies usadas como tratamentos de disfunções intestinais (75). Entretanto, algumas gram-negativas também são usadas como probióticos. O melhor exemplo é a *Escherichia coli* Nissle 1917, que foi usada por muito tempo no tratamento de constipação crônica e colite (76).

No último século, muitos trabalhos mostraram que as bactérias probióticas desempenham papéis importantes na saúde do hospedeiro. De forma geral, as bactérias produtoras de ácido láctico produzem boas quantidades de IL-10 (citocina que desempenha um papel central no controle da inflamação e no estabelecimento da tolerância imunológica da mucosa intestinal) (77). As bactérias probióticas produzem substâncias anti-microbianas (como bacteriocinas), que ajudam a reduzir a presença no lúmen intestinal de LPS e peptidoglicanos, os quais podem ser prejudiciais aos seres humanos (77). As bactérias probióticas também fermentam as fibras prebióticas, produzindo AGCC (principalmente acetato, propionato e butirato) os quais: têm ação anti-inflamatória nas células do epitélio intestinal (diminuem a expressão de NF-κB nessas células); regulam atividades metabólicas do hospedeiro (ex: metabolismo de colesterol); regulam a produção de hormônios enteroendócrinos (GLP-1, GLP-2, PYY), que desempenham ação na permeabilidade intestinal, saciedade e produção e secreção de insulina; servem como substrato energético para as bactérias benéficas do intestino, que por competição, eliminam as bactérias patogênicas (78) (Fig. 4).

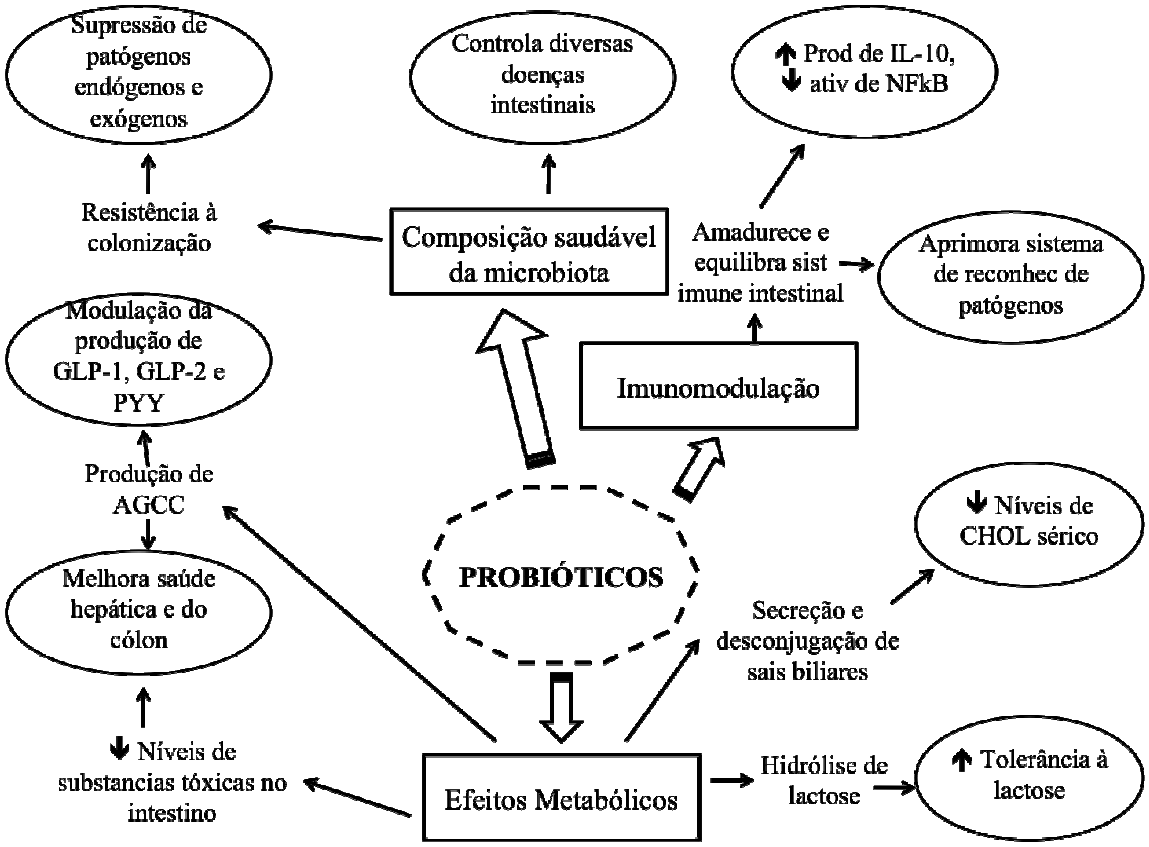
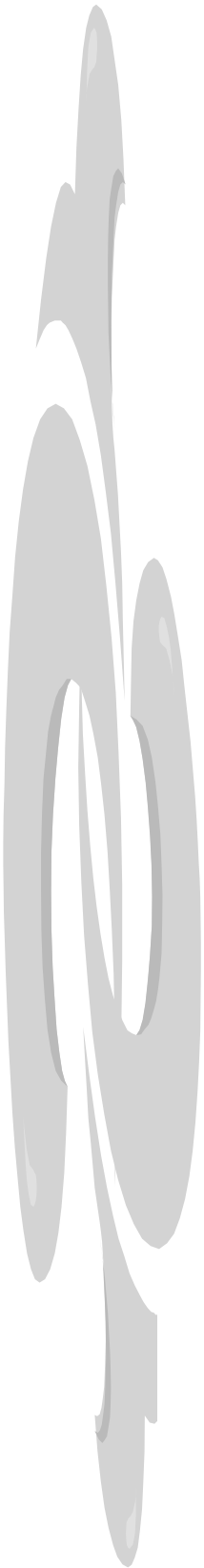


Figura 4. Mecanismos de ação dos probióticos. Esquema representativo dos principais mecanismos de ação dos probióticos na saúde do hospedeiro. Abreviações: AGCC: ácidos graxos de cadeia curta, GLP-1: *glucagon-like peptide 1*, GLP-2: *glucagon-like peptide*, IL-10: interleucina 10, NFkB: fator nuclear Kb, PYY: peptídeo YY.

Enfim, todos esses mecanismos já foram bem demonstrados e são considerados importantes para a homeostasia da microbiota intestinal, especialmente em doenças intestinais, respiratórias e alérgicas. Entretanto, aplicando esses mecanismos às doenças metabólicas, observa-se que muitos deles podem ser interessantes para o tratamento da obesidade e RI e os estudos presentes atualmente são escassos, incompletos e inconclusivos tanto em animais como em humanos (79-81). Neste sentido, esse presente trabalho pretende avaliar de uma forma mais completa a ação de algumas cepas probióticas na proteção contra inflamação e RI em um modelo experimental de obesidade.



2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

I. Avaliar o efeito do uso de probióticos no desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina; na sinalização da insulina em fígado, músculo e tecido adiposo; e no perfil histológico dos tecidos adiposo e hepático de camundongos *Swiss* tratados com dieta hiperlipídica;

II. Investigar o papel dos probióticos na permeabilidade intestinal e modulação da microbiota intestinal de camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica;

III. Avaliar o efeito dos probiótcos na via de sinalização TLR4/MyD88/IKK e JNK, além de outras proteínas inflamatórias nos camundongos *Swiss* obesos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Todos os anticorpos utilizados foram da marca Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA), com exceção dos anticorpos anti-Akt, anti-phospho-Akt, anti-TLR4 e anti-α-tubulina que foram obtidos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). A insulina recombinante humana utilizada foi da Eli Lilly e Co (Indianápolis, IN, USA). Os probióticos eram da marca Futureceuticals (Momence, IL, USA). Os outros reagentes utilizados foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos saudáveis com idade de 8 semanas provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas. Os camundongos permaneceram, durante todo o período de experimento, em gaiolas consumindo água e dieta sob o sistema de livre acesso, sendo a temperatura e umidade do ar controladas na faixa de 22 $\pm$ 1ºC e 60%-70%, respectivamente, e ciclo de claro e escuro de 12 horas.

Os animais (n=6 por grupo) foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, baseando-se no tipo de dieta e tratamento (com probióticos ou não) que iriam receber por 5 semanas:

- Grupo C: grupo denominado controle que recebeu dieta comercial convencional aliada à gavagem diária de veículo (apenas água estéril);
- Grupo C+PB: grupo denominado controle + probiótico que recebeu dieta comercial convencional aliada à gavagem diária de uma solução contendo cepas probióticas definidas (ver abaixo);
- Grupo DIO (*diet-induced obesity*): grupo de animais que receberam uma dieta hiperlipídica especial confeccionada em nosso laboratório. Essa dieta consiste na seguinte distribuição energética: 55% das calorias de lipídios, 29% de carboidratos e 16% de proteínas (Tabela 1). Os animais desse grupo foram gavados diariamente com água estéril.
- Grupo DIO+PB: esse grupo recebeu a mesma dieta hiperlipídica designada acima, aliada à gavagem diária de uma solução contendo cepas probióticas definidas (ver abaixo).

O peso corporal dos animais foi mensurado semanalmente. Níveis séricos de glicose e insulina foram avaliados ao final do período experimental (5 semanas). Nesse mesmo período foram realizados o teste de tolerância à glicose, bem como o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Para a extração de tecidos (fígado, músculo gastrocnêmio, tecido adiposo epididimal, íleo e hipotálamo) com o objetivo de analisar proteínas, RNAs intracelulares e realizar a avaliação histológica, os camundongos foram anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (40mg/kg) e a perda dos reflexos pedal e corneano foram usadas como controle da anestesia.

Tabela 1. Ingredientes e Composição Nutricional entre a dieta padrão AIN93G e a dieta modificada hiperlipídica aplicada em nosso laboratório

Ingredientes	Dieta padrão AIN93G (g/Kg)	Kcal/Kg	Dieta hiperlipídica saturada (g/Kg)	Kcal/Kg
Amido de milho	397,5	1590	115,5	462
Caseina	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido dextrinado	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Oleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mistura de minerais	35	-	35	-
Mistura de vitaminas	10	-	10	-
L-cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	**1000**	**3948**	**1000**	**5358**

Adaptado de Reeves (82)

3.3 Tratamento com probióticos

As cepas de probióticos utilizadas foram: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophillus* e *Bifidobacterium bifidum*. Durante as 5 semanas de tratamento (com dieta e probióticos), os animais receberam diariamente uma concentração de $6x10^8$ UFC de cada cepa, resultando em uma concentração final diária de $1,8x10^9$ UFC de bactérias. Os probióticos utilizados foram diluídos em 300µl de água estéril para a gavagem. Os grupos de animais que não receberam a solução contendo probióticos, foram gavados diariamente e durante o mesmo período com 300µl de água estéril.

3.4 Níveis sanguíneos de citocinas, insulina e glicose

Ao final do tratamento com probióticos, amostras de sangue foram coletadas para a determinação de insulina basal, TNF-α, GLP-1 e IL-6, utilizando Kits de ELISA (***E**nzyme **L**inked **I**mmunono**S**orbent **A**ssay*) das marcas Millipore (St Charles, MO, USA) para insulina e Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA) para as outras moléculas analisadas. Os ensaios foram realizados de acordo com as especificações do fabricante. Os valores de glicose foram mensurados a partir do sangue venoso da cauda dos animais utilizando o glicosímetro (Bayer).

3.5 Níveis Portais de LPS

Amostras de soro estéreis, obtidas a partir do sangue venoso portal, foram diluídas a 20% (vol./vol.) com água livre de endotoxinas. Essas amostras diluídas foram então aquecidas a 70^{o}C por 10 minutos para inativar proteínas séricas. O LPS foi quantificado usando-se um kit disponível comercialmente chamado Limulus Amebocyte Assay (Cambrex, Walkersville, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal

Após jejum de 8 horas, o sangue venoso da cauda dos animais, foi extraído para avaliação de glicemia e insulinemia de jejum. Depois, a glicose na concentração de 1g/kg foi injetada intraperitonealmente e, novamente, amostras de sangue venoso da cauda do

animal foram retiradas após 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção para analise dos níveis glicêmicos e insulinêmicos nesses pontos.

3.7 Clamp Euglicêmico-Hiperinsulinêmico

Após 5 semanas de tratamento com probióticos, seguido de jejum noturno de 8 horas, os camundongos foram anestesiados para a cirurgia de implante de catéteres. Os animais foram então submetidos ao Clamp Euglicêmico-Hiperinsulinêmico com a duração de 120 minutos e com uma infusão contínua de insulina (30 mU Kg_{-1} min_{-1}). A glicemia foi aferida a cada 5 minutos e a glicose (em uma concentração de 5% do peso corporal/volume) foi infundida em uma taxa variada para manter a glicemia entre 90-100mg/dl.

3.8 Extração de Tecidos

Os animais permaneceram em jejum por 12 horas antes da extração de tecidos. Eles foram anestesiados e a cavidade abdominal de cada um foi aberta para a exposição da veia porta, onde foi injetado 0,2ml de salina, com ou sem a presença de insulina (10^{-6} $mol.l^{-1}$). Após 30 segundos da injeção de insulina, o fígado foi removido e 90 segundos depois, o músculo gastrocnêmio e o tecido adiposo epididimal foram extraídos, picados grosseiramente e homogeneizados imediatamente em TRIZOL (Invitrogen), para obtenção de RNA; ou em um tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10

mM vanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4ºC, usando um polytron (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), operado em máxima velocidade por 30 s. Em todas as amostras com tampão de extração de proteínas foi adicionado triton X-100 1% e as mesmas permaneceram no gelo por 40 minutos. O material extraído foi então centrifugado na velocidade de 11000 rpm por 40 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração protéica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto e outra parte foi utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4ºC até o momento de submeter à fervura a 100ºC durante 5 minutos. As técnicas de imunoprecipitação e imunoblot serão descritas a seguir.

3.9 Preparo de Proteínas e Análise de Western Blots

3.9.1 Imunoprecipitação (MyD88/TLR4)

Adicionaram-se às amostras anticorpos específicos para imunoprecipitação (anti-MyD88). A incubação permaneceu em constante agitação por um período de 12 horas. Em seguida, os imunocomplexos foram recuperados com Proteina A Sepharose 6 MB por 2 horas à 4°C e decantados por centrifugação por 15 minutos à 4°C/11000 rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl; 1 mM RDTA; 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado, ficando-se apenas com as proteínas precipitadas

(imunocomplexos). Adicionou-se Laemmli acrescido de DTT e após rápida fervura de 5 minutos as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE).

3.9.2 Western blots

Após determinação de proteína de cada amostra (extrato total), estes foram ressuspensos em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT. Assim como os imunocomplexos, houve rápida fervura das amostras que e em seguida foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada "overnight" com anticorpo especifico. A ligação de anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1,5 hora. O sinal foi detectado por tratamento com 2 μCi de [^{125}I] Proteina A (30 μCi/μg) em 10 mL de tampão de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente (20 ºC) e exposição a filmes de RX Kodak à -80°C de 12-48 horas. As bandas identificadas nas auto-radiografias foram quantificadas através de densitometria.

3.10 Extração de RNA e PCR *Real Time*

3.10.1 Extração de RNA total

Os tecidos de interesse foram homogeneizados em Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e o RNA foi isolado dos tecidos de interesse seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram conservadas a -80C°. O tratamento com DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi realizado com a finalidade de eliminar possível contaminação do material com DNA genômico. O RNA solubilizado em água DEPC foi quantificado em espectrofotômetro (260nm).

3.10.2 Transcrição Reversa

Um µg das amostras foram submetidas a transcrição reversa (RT) segundo o protocolo do kit ThermoScript^{TM} RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O cDNA sintetizado foi quantificado em espectrofotômetro.

3.10.3 Reação de PCR *Real Time*

Para a amplificação das amostras, 20ng de cDNA foram acrescentados 300nM de *primers* específicos dos genes selecionados e 12,5µl de SYBR® Green Master Mix PCR (Aplied Biosystems - Carlsbad, CA, USA). Controles sem adição de *primers* também foram utilizados e todas as amostras foram processadas em triplicata na mesma placa de 96 poços (MicroAmp Optical 96-well reaction plate - Applied Biosystems - Carlsbad,

CA, USA). As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final de cada reação foi utilizado o protocolo de dissociação, a fim de se avaliar a presença de amplificação inespecífica.

Os *primers* utilizados para a amplificação estão na Tabela 2. Para fins de normalização e referência para quantificação, em cada amostra de cDNA será amplificado gene de manutenção celular *GAPDH*.

A análise relativa dos dados será obtida pela derivação da fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta CT}$, que determina os níveis de expressão gênica das amostras sempre em relação à amostra calibradora, como descreve o manual do equipamento (ABI 5700 Sequence Detector System - Applied Biosystems).

Tabela 2. Seqüências de Primers de camundongos para PCR *Real-Time* quantitativo

Nome do Gene	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
Anglp-4 (Fiaf)	GGGACCTTAACTGTGCCAAGAG	GGAAGTATTGTCCATTGAGATTGGA
CD14	CTTCCCACAGGCAGCACAG	AATGATGAGAGGCAGCAAGAGG
GAPDH	CTCATGACCACAGTCCATGC	CACATTGGGGGTAGGAACAC
IL-1β	AAATGCCTCGTGCTGTCTGACC	CTGCTTGAGAGGTGCTGA TGTACC
IL-6	GGAAATCGTGGAAATGAGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTCATAC
NPY	AATCAGTGTCTCAGGGCTGGAT	CCGCTCTGCGACACTACATC
POMC	AAGAGCAGTGACTAAGAGAGGCCA	ACATCTATGGAGGTCTGAAGCAGG
Pro-glucagon	TGGCAGCACGCCCTTC	GCGCTTCTGTCTGGGA
TLR4	GCAGAAAATGCCAGGATGATG	AACTACCTCTATGCAGGGATTCAAG
TNF-α	AGTTCCCAAATGGCCTCCC	TGTCACTCGAATTTTGAGAAGATG

3.11 Histologia e Imunohistoquímica

Fragmentos de tecido adiposo e fígado dos camundongos ao final do tratamento foram retirados para procedimento histológico. Os tecidos foram imediatamente colocados em um recipiente contendo paraformoldeído tamponado a 4% e ficaram por pelo menos 6 horas em banho para adequada fixação. Posteriormente, os tecidos foram processados com álcool em crescentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), xilol e parafina, incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 μm com o auxílio de um micrótomo e fixados em lâminas de microscopia. Para a visualização das estruturas em microscópio óptico, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. No tecido adiposo, a área de superfície media dos adipócitos, usando o programa Image J, conforme previamente descrito (83).

Para a imunohistoquimica, os cortes de 5 μm de tecido adiposo foram fixados em lâminas silanizadas e posteriormente submetidos à marcação simples, utilizando o anticorpo F4/80+, e detectados através do kit de imuno-histoquímica (ADVANCE™ HRP, Dako Cytomation) seguindo instruções do fabricante. A análise e a documentação dos resultados foram realizadas utilizando microscópio e a avaliação semiquantitativa de F4/80 foi determinada por contagem do número de células positivamente coradas pelo anticorpo no tecido adiposo. O tecido adiposo também foi avaliado pela densidade de crown-like structures (número médio de CLS dentro de 10 campos de alta potência por animal).

3.12 Metagenômica

3.12.1 Extração de DNA

Amostras de fezes dos animais foram retiradas do cólon distal, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80^{o}C. O DNA das bactérias foi extraído usando QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Alíquotas de 2 µl dos produtos de extração foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) para confirmação da extração e a integridade do DNA.

3.12.2 Montagem das bibliotecas

A estratégia baseou-se no uso de pares de *primers* para amplificação de produtos específicos contendo MIDs (seqüências específicas para cada amostra como um códigos de barras) e adaptadores específicos para o seqüenciamento 454. Quando o PCR foi feito, o *primer* garantiu a especificidade do produto e incorporou a MID e o adaptador ao fragmento amplificado (Fig. 5).

Uma biblioteca de produtos de PCR (amplicons) da subunidade menor do RNA ribossomal (região hipervariável dos genes V2-V3) foi gerada dessa maneira para cada amostra com uma polimerase de alta fidelidade. A PCR foi realizada utilizando o par de *primers* descrito por Chakravorty et al. (84): Primer Forward: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Primer Reverse: 5'-GCTGCCTYCCGTAGGAGT-

3’. A integridade dos amplicons foi analisada em gel de agarose. As bandas correspondentes foram cortadas e purificadas a partir do gel.

Após uma quantificação com fluorescência com o QuantiT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as bibliotecas foram misturadas em concentrações equimolares e novamente purificadas com o kit AMPURE XP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O controle da qualidade do pool de amplicons foi feito através do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Alemanha) e uma nova quantificação do material foi obtida com o QuantiT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O seqüenciamento unidirecional foi realizado através do Sistema da plataforma da Roche 454 GS-FLX+ (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha).

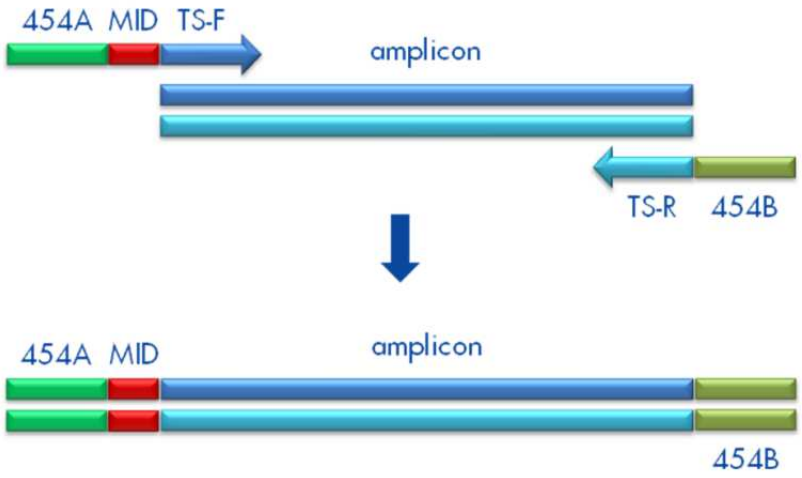


Figura 5. Confecção de PCRs com seqüências específicas para identificação e seqüenciamento dos amplicons

3.12.3 Análise dos resultados

Os dados brutos de seqüenciamento foram filtrados e triados de acordo com a qualidade. As seqüências foram cortadas através da remoção das seqüências de *primers*, dados de baixa qualidade, seqüências que não correspondiam ao *primer,* que possuíam dados ambíguos ou que eram menores que 50 nt. O pool de seqüencias foi separado por amostra através das identificações nas MIDs. Os dados tratados foram analisados por bioinformática utilizando "*Basic Local Alignment Search Tool X*" (BLASTX), observados com o software METAREP, e comparados segundo a prevalência dos filos entre os grupos.

3.13 Sinalização de insulina e leptina no hipotálamo

3.13.1 Canulação Intracerebroventricular

Para ambos os estudos de sinalização hipotalâmica da insulina e medida da ingestão alimentar, os camundongos *Swiss* foram estereotaxicamente instrumentados sob injeção intraperitoneal de uma mistura de quetamina (10 mg) e diazepam (0,07 mg) (0,2 ml/100 g de peso corporal). Após a anestesia total do animal, foi implantado assepticamente uma cânula (agulha de tamanho 26G feita de aço inoxidável) dentro do terceiro ventrículo, seguindo as coordenadas a partir do bregma, -1,8 mm ântero posterior e -5,0 mm abaixo da superfície do crânio dos camundongos, tal como descrito anteriormente (14).

3.13.2 Injeção intracerebroventricular de insulina

Depois de 5 semanas de tratamento, 5 animais de cada grupo (C, C+PB, DIO e DIO+PB) foram colocados em gaiolas metabólicas. Após 3 dias de adaptação, eles foram privados de comida por duas horas, com livre acesso à água, e receberam infusão intracerebroventricular (ICV) de salina ou insulina (200 mU em 2µl; Eli Lilly and Company, Indianápolis, EUA) às 18:00 para avaliar a ingestão de alimentos. O consumo alimentar foi determinado medindo a diferença entre o peso da dieta dos grupos C, C+PB, DIO e DIO+PB no final de um período de 4h ou 12h. Para a análise de sinalização de insulina no hipotálamo, *Western Blotting* foi realizado e a insulina foi injetada 15 minutos antes da extração do tecido hipotalâmico.

3.13.3 Injeção intraperitoneal de leptina

Depois de 5 semanas de tratamento, 5 animais de cada grupo (C, C+PB, DIO e DIO+PB) foram colocados em gaiolas metabólicas. Após 3 dias de adaptação, eles receberam uma injeção intraperitoneal (IP) de salina por 2 dias aproximadamente às 18:00. A partir do terceiro dia, alguns animais de cada grupo (escolhidos aleatoriamente) receberam a injeção de leptina recombinante (3mg/kg de peso corporal; Calbiochem®, San Diego, CA, USA), enquanto os outros continuaram recebendo salina no mesmo horário, como previamente descrito (85) e por 4 dias consecutivos. O peso corporal e a ingestão alimentar foram aferidos diariamente antes e depois da infusão de leptina. Para a

análise hipotalâmica da sinalização da leptina, a técnica de *Western Blotting* foi realizada e a leptina foi injetada intraperitonealmente 45 minutos antes da extração do tecido.

3.13.3 Determinação de Ingestão Alimentar

Os tratamentos intraperitoneal e intracerebroventricular dos hormônios foram realizados entre 17:30 e 18:00. Logo após, as dietas foram oferecidas aos quatro grupos e a ingestão alimentar foi determinada pela aferição da diferença entre o peso da dieta oferecida inicialmente e ao final do período de 4, 12 ou 24 horas.

3.14 Análise Estatística

Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão da média. A comparação entre 2 médias foi feita pelo teste t de Student não pareado e entre 3 ou mais medias por análise de variância (two-way ANOVA) e em seguida aplicação do teste post-hoc de Bonferroni, com nível de significância pré-fixado em $P<0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros fisiológicos e metabólicos

A figura 6 mostra dados metabólicos comparativos considerando os 4 grupos do estudo: controles (C), controles tratados com probióticos (C+PB), obesos (DIO) e obesos tratados com probióticos (DIO+PB). O ganho de peso e a quantidade de gordura epididimal tiveram valores muitos semelhantes entre os grupos de animais controles. Entretanto, houve um grande aumento no ganho de peso e na gordura epididimal no grupo DIO (quando comparado com os controles) e o uso de probióticos proporcionou uma redução significativa nesses parâmetros (Fig. 6 A, B). Relações semelhantes também foram encontradas para os valores plasmáticos de glicemia de jejum e séricos de insulina de jejum (Fig. 6 D, E). Os níveis séricos da adiponectina tiveram valores similares entre os grupos C e C+PB e um aumento significativo foi observado no grupo DIO+PB em relação ao DIO (Fig. 6 C).

Em relação aos testes que avaliam a resistência à insulina dos animais, os camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica mostraram uma grande redução na taxa de infusão de glicose mensurada pelo clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico quando comparada com os grupos controles. Depois do tratamento com probióticos por 5 semanas, a sensibilidade à insulina foi parcialmente restaurada (Fig. 6 F). O teste de tolerância à glicose intraperitoneal foi realizado e o uso de probióticos em animais obesos também foi capaz de melhorar os valores de glicemia e insulina em todos os tempos avaliados no teste (Fig. 7 A-D).

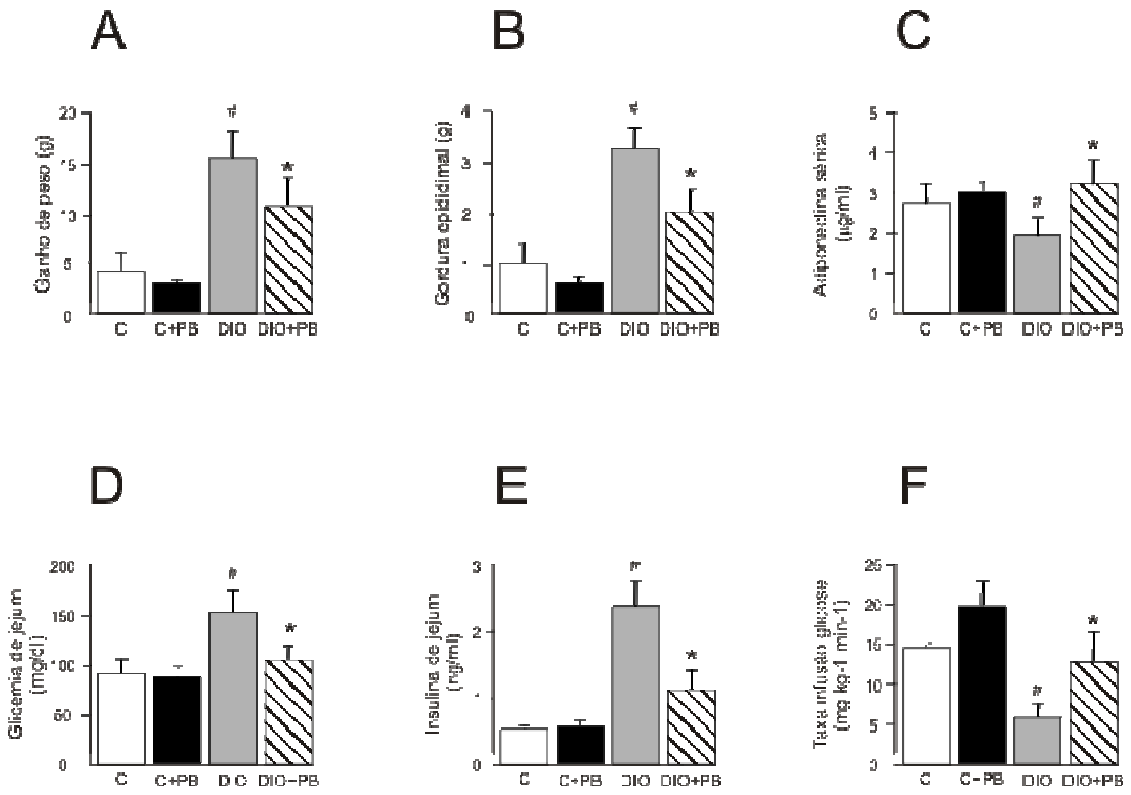


Figura 6. Parâmetros fisiológicos e metabólicos de camundongos controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas (C+PB), obesos (DIO) e obesos tratados com probióticos por 5 semanas (DIO+PB). A, ganho de peso; B, gordura epididimal; C, adiponectina; D, glicemia de jejum; E, insulina de jejum; F, clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico. Dados representam media $\pm$ DP de 10 camundongos por grupo. * $p<0,05$ comparado com DIO e # $p<0,05$ comparado com controle.

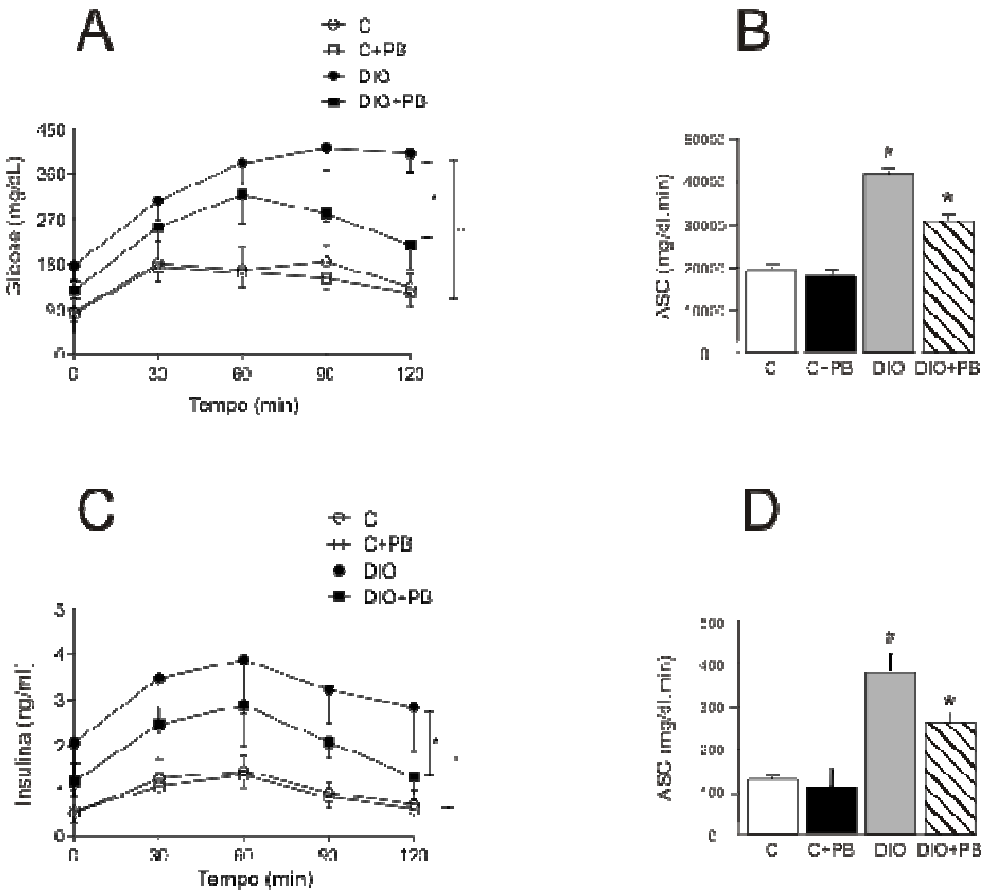


Figura 7. Teste de tolerância à glicose (TTG) realizado em camundongos controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas (C+PB), obesos (DIO) e obesos tratados com probióticos por 5 semanas (DIO+PB). A-B, curva glicêmica e área sobre a curva (ASC) durante o TTG; C-D, curva insulinêmica e ASC durante o TTG. Dados representam media $\pm$ DP de 12 camundongos por grupo. * $p<0,05$ comparado com DIO e # $p<0,05$ comparado com controle.

4.2 Efeitos da suplementação de probióticos na via de sinalização da insulina em tecidos insulino-sensíveis

Como observamos mudanças positivas nos efeitos fisiológicos da insulina com o tratamento de probióticos nos camundongos DIO, nós decidimos examinar os efeitos da administração dessas bactérias benéficas na via de sinalização da insulina em seus tecidos-alvos clássicos. Como esperado, no fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo epididimal dos animais tratados com dieta hiperlipídica os níveis de fosforilação em tirosina de IRβ, IRS1 e de fosforilação em serina de Akt foram significativamente reduzidos quando comparados com os níveis de fosforilação dos grupos com animais controles (C e C+PB), os quais não apresentaram diferenças de fosforilação entre eles (Fig. 8 A-I). Além disso, o grupo de animais obesos tratados com probióticos exibiu uma maior fosforilação dessas proteínas quando comparado com o grupo não tratado, com exceção da fosforilação IRS1 em fígado, que exibiu níveis de fosforilação semelhantes aos camundongos obesos e não tratados (Fig. 8 B). Não houve diferenças na expressão das proteínas totais Irβ, IRS1 e Akt entre os grupos C, C+PB, DIO, DIO+PB.

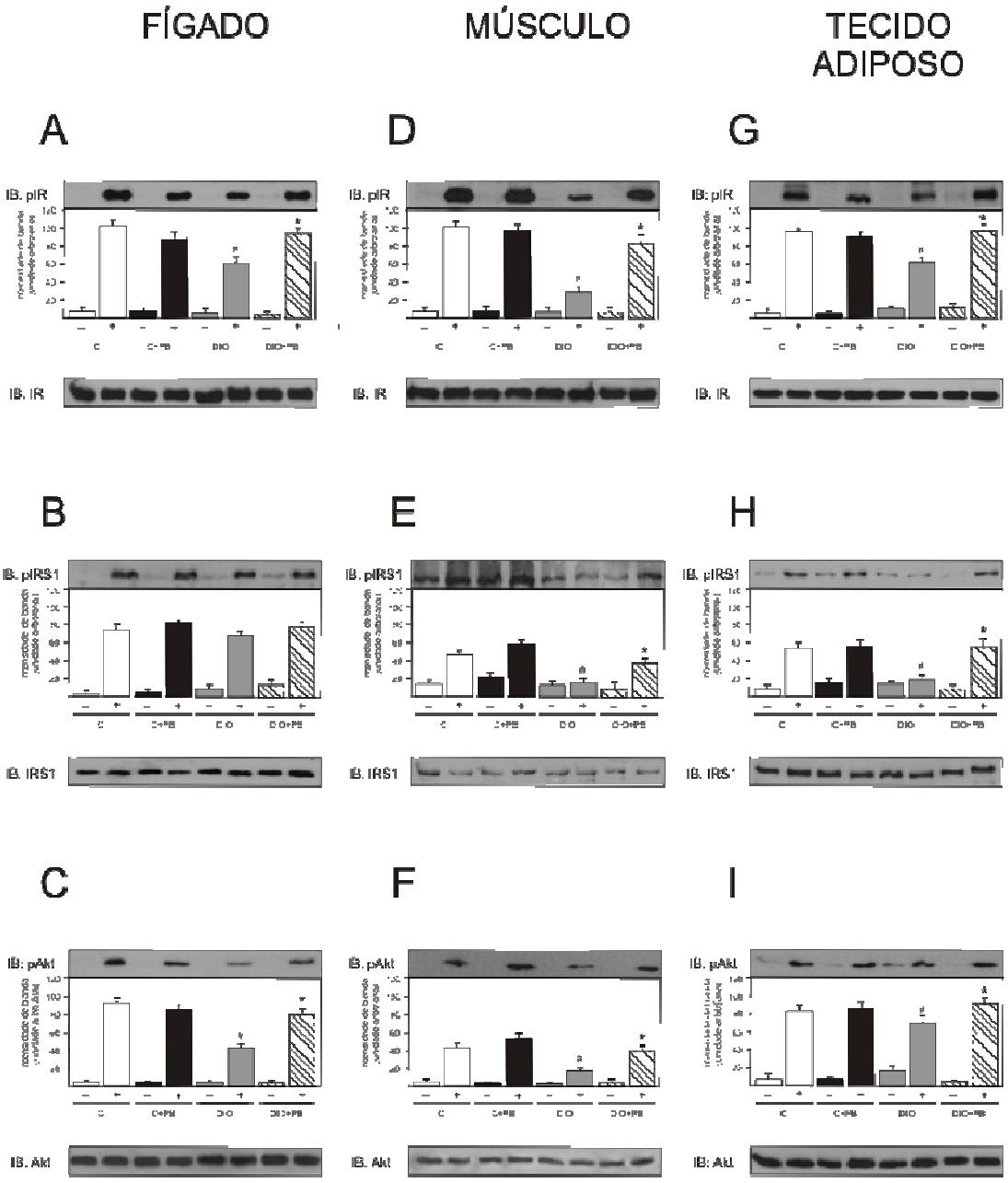


Figura 8. Efeitos da administração de probióticos na via de sinalização da insulina em animais tratados com dieta hiperlipídica e controles. A-C, blots representativos da fosforilação em tirosina no fígado de Irβ (A), IRS1 (B) e fosforilação em serina no mesmo tecido da Akt (C) de animais controles, C+PB, DIO, DIO+PB (blots superiores) e expressão das mesmas proteínas em suas formas não fosforiladas (blots inferiores). D-F, blots representativos da fosforilação em tirosina no músculo esquelético de Irβ (D), IRS1 (E) e fosforilação em serina no mesmo tecido da Akt (F) de animais controles, C+PB, DIO, DIO+PB (blots superiores) e expressão das mesmas proteínas em suas formas não fosforiladas (blots inferiores). G-I, blots representativos da fosforilação em tirosina no tecido adiposo epididimal de Irβ (G), IRS1 (H) e fosforilação em serina no mesmo tecido da Akt (I) de animais controles, C+PB, DIO, DIO+PB (blots superiores) e expressão das mesmas proteínas em suas formas não fosforiladas (blots inferiores). Cada barra representa a média $\pm$ DP da quantificação densitométrica de blots resultantes de 3 experimentos diferentes. * $p<0,05$ comparado com DIO e # $p<0,05$ comparado com controle.
IB – immunoblot; p – fosforilado.

4.3 Efeitos da suplementação de probióticos na via de sinalização TLR4 em tecidos insulino-sensíveis

Como esperado, o tratamento com a dieta hiperlipídica ativou a sinalização do receptor de sistema imune inato TLR4 em fígado, músculo e tecido adiposo nos animais do grupo DIO. Este fato foi observado pela maior interação do TLR4 com sua proteína adaptadora MyD-88 (Fig. 9 B, D, F). Esse evento resultou em maior fosforilação e ativação das serina-quinases JNK, IKKβ e fosforilação e degradação de IκBα, elevando conseqüentemente a fosforilação de IRS1 no resíduo Ser307, que por sua vez induziu RI nos três tecidos analisados. A ativação da sinalização TLR4 também proporcionou maiores níveis de iNOS nos tecidos insulino-sensíveis, molécula capaz de gerar resistência à insulina por mecanismos de S-nitrosação (Fig. 9 A, C, E). A administração de probióticos juntamente com a dieta hiperlipídica foi capaz de reduzir a ativação da sinalização do TLR4, diminuindo conseqüentemente a ativação das serina-quinases JNK, IKKβ, a fosforilição de IκBα e de IRS1 em Ser307 e os níveis de iNOS (Fig. 9 A-F). Em relação aos camundongos controles, o uso de probióticos não proporcionou mudanças na sinalização do receptor TLR4, com exceção da proteína iNOS, que reduziu de forma significativa no fígado, músculo e tecido adiposo dos controles tratados (Fig. 9 A, C, E).

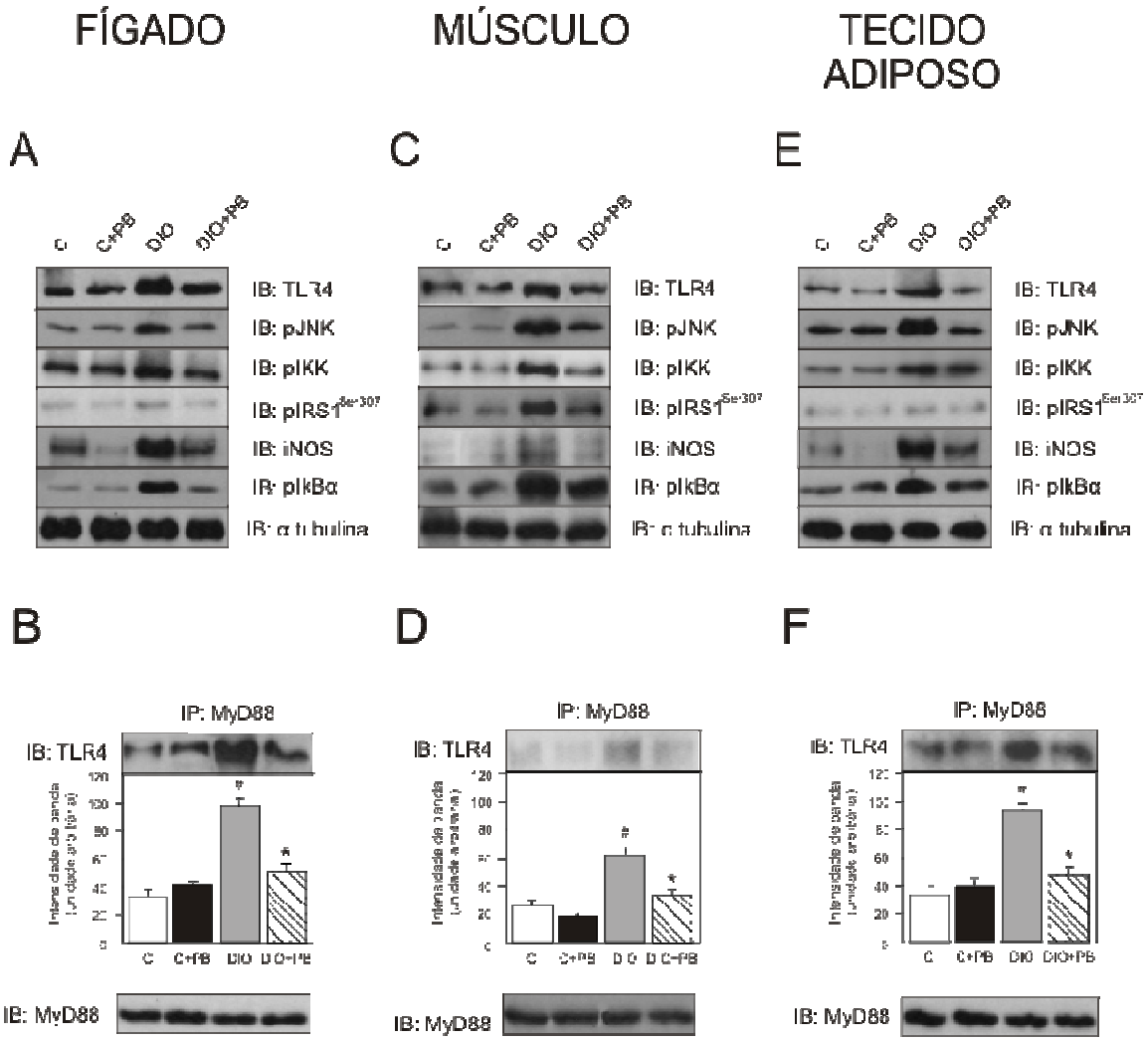


Figura 9. Efeitos da administração de probióticos na ativação do TLR4 (B, D, F) e nas principais proteínas de sua sinalização (A, C, E) em camundongos controles e DIO. Esses efeitos foram avaliados no fígado (A, B), músculo esquelético (C, D) e tecido adiposo epididimal (E, F). Cada barra representa a media ± DP da quantificação densitométrica de blots resultantes de 3 experimentos diferentes. * p<0,05 comparado com DIO e # p<0,05 comparado com controle.
IB – immunoblot; p – fosforilado.

4.4 Efeitos da suplementação de probióticos nos níveis teciduais e circulantes de citocinas inflamatórias

A expressão de mRNA das citocinas TNF-α, IL-6 e IL-1β foram examinadas em fígado, músculo e tecido adiposo. Os níveis de mRNA de citocinas nos camundongos DIO eram maiores do que os grupos controles (C e C+PB) (Fig. 10 A-I). Já a quantidade relativa dos transcritos de TNF-α, IL-6 e IL-1β no grupo DIO+PB diminuiu significativamente quando comparado com o grupo DIO (Fig. 10 A-I). Em adição, nós analisamos as concentrações séricas de TNF-α e IL-6, que diminuíram com o tratamento com probióticos nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica em relação aos não tratados. Os níveis circulantes dessas citocinas permaneceram estáveis entre os grupos controles (C e C+PB) (Fig. 10 J, K).

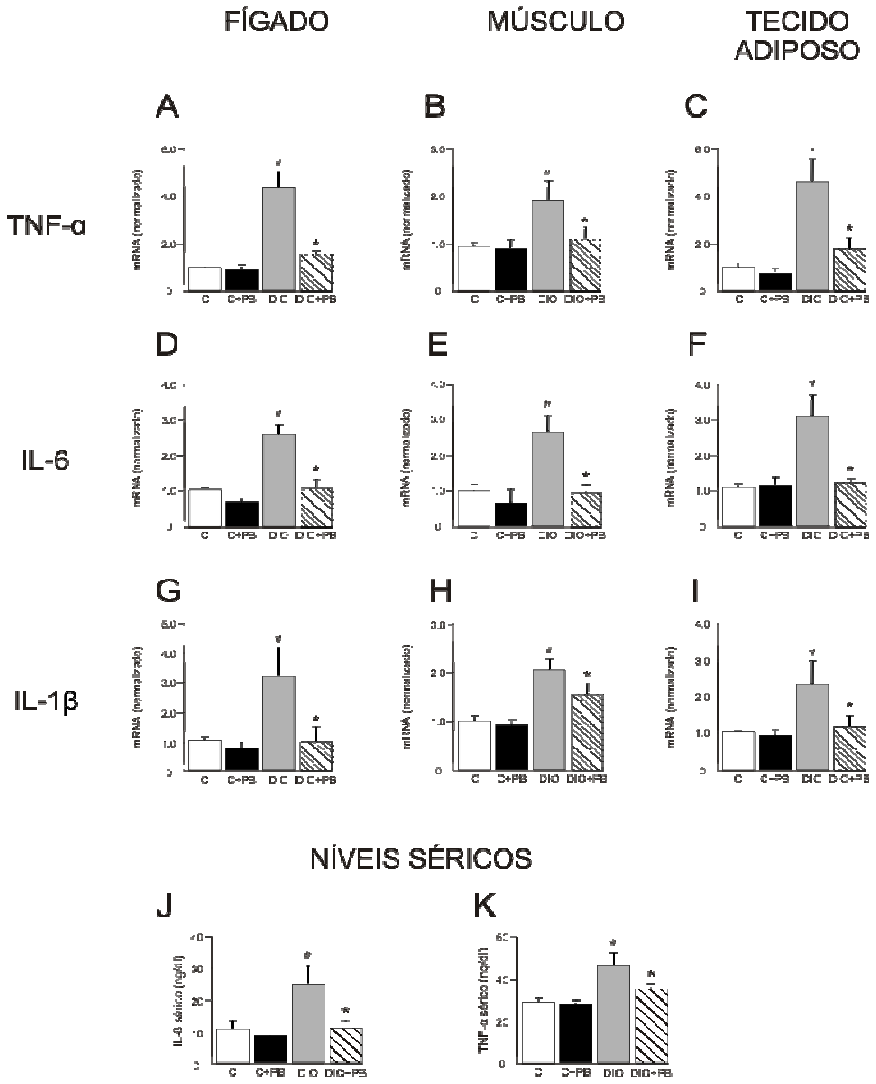


Figura 10. Níveis teciduais de mRNA de IL-1β, IL-6 e TNF-α e níveis séricos de IL-6 e TNF-α em animais controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas (C+PB), obesos (DIO) e obesos tratados com probióticos por 5 semanas (DIO+PB). A-C, determinação da expressão de mRNA de TNF-α por qPCR RT em fígado (A), músculo esquelético (B) e tecido adiposo epididimal (C); D-F, determinação da expressão de mRNA de IL-6 por qPCR RT em fígado (D), músculo esquelético (E) e tecido adiposo epididimal (F); G-I, determinação da expressão de mRNA de IL-1β por qPCR RT em fígado (G), músculo esquelético (H) e tecido adiposo epididimal (I); J e K, determinação de IL-6 e TNF-α séricos por ELISA. Dados representam média $\pm$ DP de 8 camundongos por grupo. * $p<0,05$ comparado com DIO e # $p<0,05$ comparado com controle.

4.5 Efeitos do tratamento com probióticos na microbiota intestinal

Baseando-se na análise por 16S rRNA da seqüência metagenômica das fezes dos animais, nós observamos uma mudança de perfil da microbiota dependendo do tipo de dieta consumida e do uso ou não de probióticos. Entre os camundongos controles, o tratamento com probióticos aumentou a prevalência de Firmicutes e Actinobacteria e diminuiu a presença de Bacteroidetes em relação aos animais não tratados. Já entre os camundongos alimentados com ração e os alimentados com dieta hiperlipídica, grandes mudanças de perfil de microbiota podem ser pontuadas: houve um aumento considerável na prevalência de Bacteroidetes e redução no filo Firmicutes e Actinobacteria nos animais DIO quando comparado aos do grupo C. E por fim, o uso de probióticos nos animais obesos, em relação aos obesos não tratados, proporcionou a manutenção da presença de Bacteroidetes, o aumento na prevalência de Actinobacteria e a redução no filo Firmicutes. A administração de probióticos também promoveu uma maior variedade de filos presentes nas fezes nesses animais (Fig. 11 A-D).

A figura 11 ainda mostra a distribuição de alguns gêneros dos filos Bacteroidetes e Firmicutes nos grupos DIO e DIO+PB. Apesar do tratamento com probióticos não ter mudado a prevalência de Bacteroidetes nos animais tratados com dieta hiperlipídica, houve uma grande mudança na concentração de alguns gêneros: o gênero *Bacteroides* e *Alistipes* aumentaram de maneira relevante em relação aos animais obesos não tratados. Em adição, no filo Firmicutes, a administração de probióticos proporcionou uma redução dos gêneros *Robinsoniella* e *Riminococcus* quando comparado com o grupo DIO (Fig. 11 E, F).

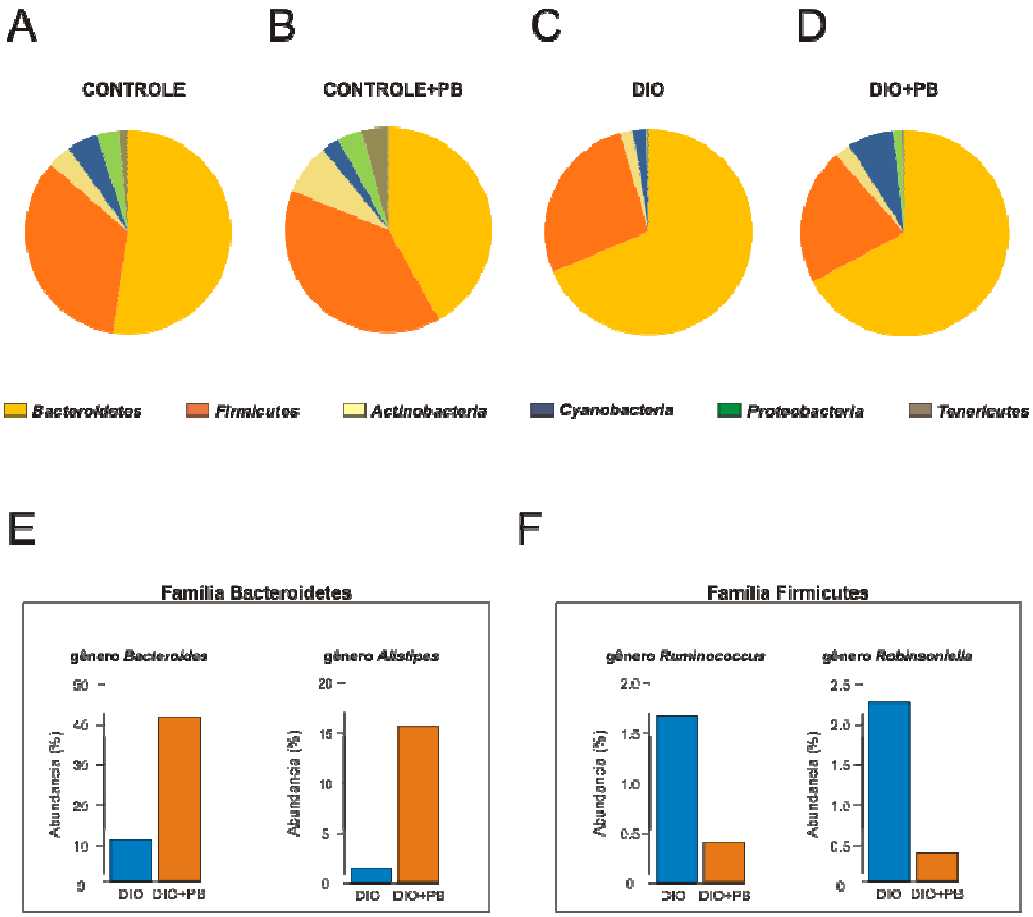


Figura 11. Análise metagenômica da prevalência e distribuição de filos da microbiota intestinal de camundongos controles (A), controles tratados com probióticos por 5 semanas (B), obesos (C) e obesos tratados com probióticos por 5 semanas (D). E e F, prevalência de alguns gêneros dentro das famílias Bacteroidetes e Firmicutes dos animais obesos e obesos tratados com probióticos. Os gráficos com os filos foram extraídos usando o software METAREP baseado na analise BLASTX dos DNAs extraídos das fezes dos camundongos.

4.6 Efeitos do uso de probióticos na modulação da expressão de proteínas e mRNA envolvidos com os equilíbrios metabólico e imunológico do íleo

Depois de observar as mudanças na microbiota das fezes, fomos verificar se tais alterações poderiam modular o sistema imunológico e a permeabilidade intestinais, mais especificamente no íleo. No que diz respeito à permeabilidade, foram avaliadas duas proteínas de *tight-junctions* muito importantes: ZO-1 e Ocludina. Ambas as proteínas estavam reduzidas nos camundongos DIO comparados aos controles, enquanto que o uso de probióticos nos animais obesos restaurou parcialmente a expressão dessas proteínas (Fig. 12 D, E). E foi provavelmente pela modulação na permeabilidade intestinal, que os valores portais de LPS do grupo DIO+PB reduziram de forma significativa quando comparados com os do grupo DIO, quase se igualando aos valores dos controles (Fig. 12 H). Alem disso, uso de probióticos em controles não modificou o padrão de expressão de proteínas *tight-junctions* (Fig. 12 D, E). O tratamento com probiótico nos animais DIO também diminuiu os altos níveis de mRNA de CD14 e da proteína NOD1 no íleo para parâmetros de expressão semelhantes aos dos controles (Fig. 12 C, F).

A administração de probióticos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ainda aumentou a expressão em íleo do mRNA Fiaf e os níveis circulantes de GLP-1 (Fig. 12 A,G), quando comparados aos não tratados, proporcionando modulações metabólicas sistêmicas importantes. Em concordância com os níveis circulantes de GLP-1, verificamos variações favoráveis nas quantidades do mRNA pro-glucagon (precursor de GLP-1) entre os grupos, com diminuição da expressão gênica em

animais obesos em relação aos controles e o reversão parcial da expressão com o tratamento com probióticos (Fig. 12 B).

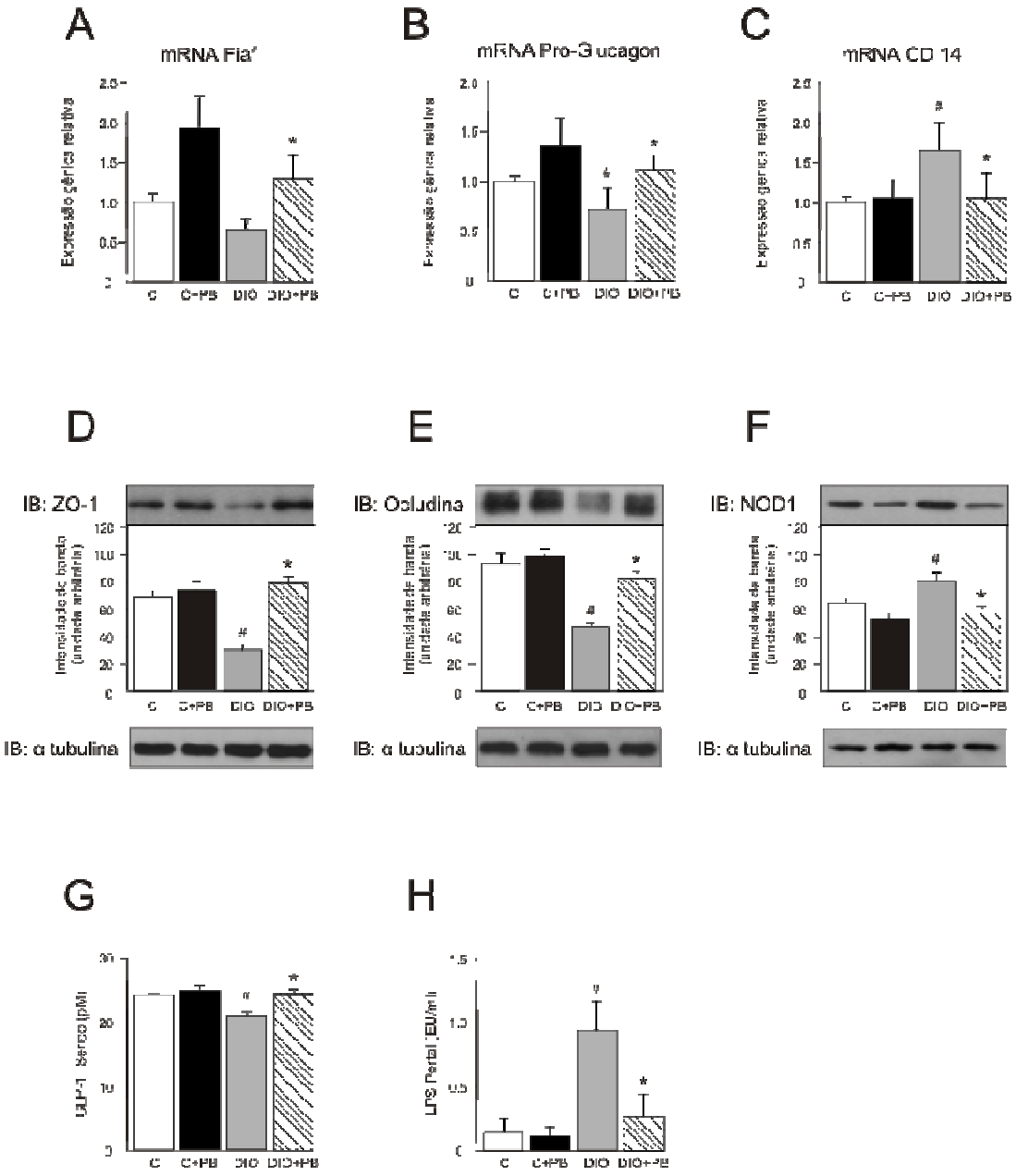


Figura 12. Efeitos da administração de probióticos na expressão de proteínas de *tight-junctions* e nas modulações metabólica e imunológica do intestino (íleo). A: níveis ileais de mRNA de Fiaf; C e F: moléculas do sistema de reconhecimento de patógenos, mRNA de CD14 (C), proteína NOD1 (F) em íleo; D e E: proteínas de *tight-junctions,* ZO-1 (D) e Ocludina (E), presentes no íleo; B e G: concentrações séricas de GLP-1 (G) e de seu precursor intestinal pro-glucagon (B); H: níveis portais de LPS em camundongos controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas, obesos e obesos tratados com probióticos por 5 semanas. Dados são apresentados como media ± DP de 6 animais por grupo. * p<0,05 comparado com DIO e # p<0,05 comparado com controle. IB – immunoblotting.

4.7 Efeitos do tratamento com probióticos na histologia de fígado e tecido adiposo e na infiltração de macrófagos no tecido adiposo

A visualização microscópica do tecido hepático revelou que o tratamento com dieta hiperlipídica promoveu o desenvolvimento de esteatose hepática, enquanto que o uso de probiótico nessas condições praticamente impediu o acúmulo de gordura no fígado, proporcionando uma imagem muito semelhante a imagens de parênquima hepático saudável (Fig. 13 A-D).

A avaliação do tecido adiposo revelou diferenças significativas no tamanho dos adipócitos do grupos DIO em relação aos grupos controles. Entretanto, entre os grupos DIO, observou-se que o uso de probióticos foi capaz de diminuir a área dos adipócitos de forma relevante, porém ainda distante dos valores dos controles. Essa diferença de tamanho dos adipócitos torna-se clara quando a relacionamos com o menor ganho de peso do grupo DIO+PB em relação ao grupo DIO. A dieta hiperlipídica proporcionou uma grande infiltração de macrófagos no tecido adiposo, determinada pela coloração F4/80+, mas o tratamento com probióticos foi capaz de reduzir tal infiltração e também o número de *crown-like structures*, que estavam abundantemente presentes nos animais DIO (Fig 14 A-F).

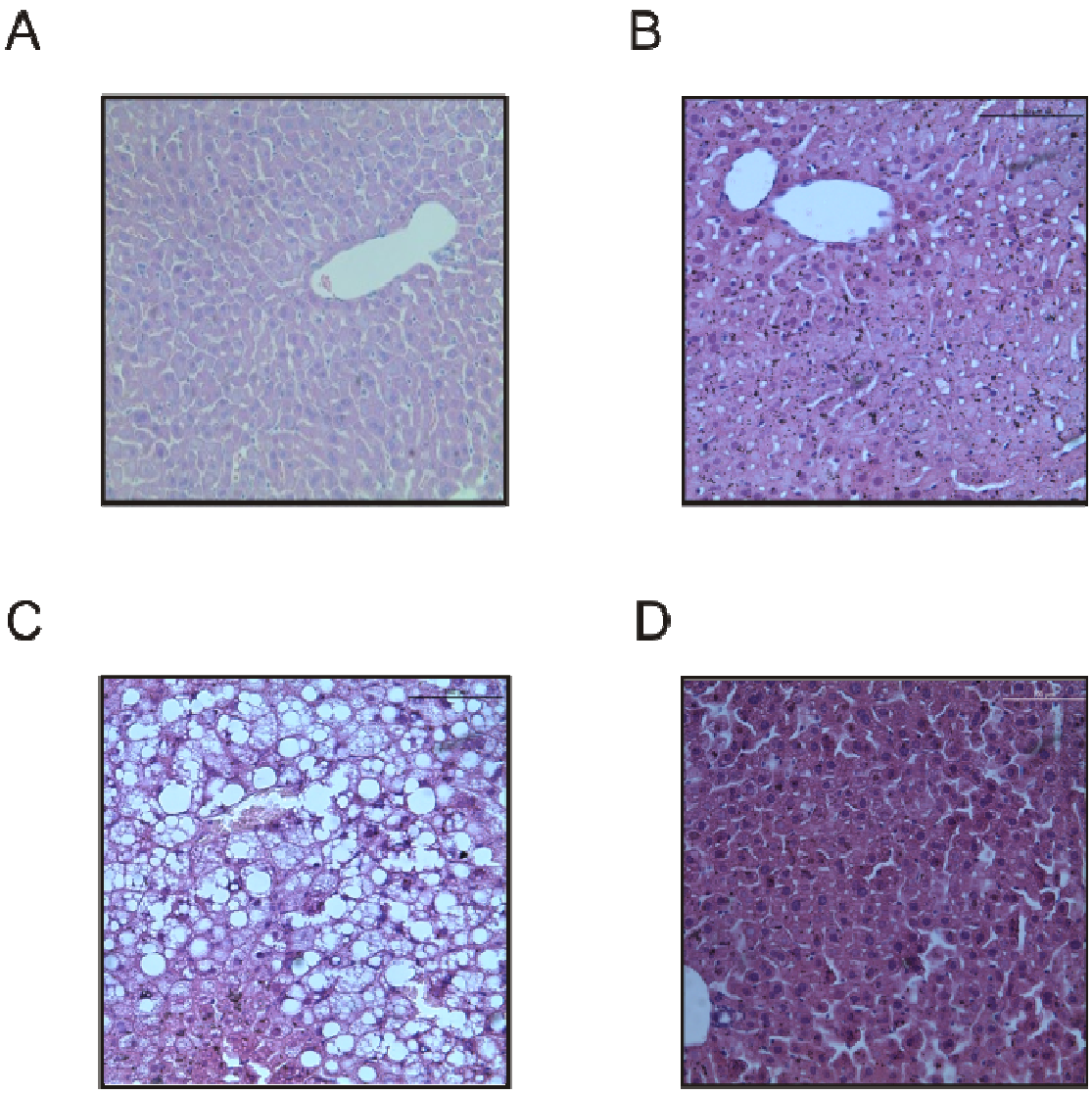


Figura 13. Caracterização morfológica de amostras de fígado. Coloração hematoxilina e eosina de seções histológicas de 5µm de parênquima de fígado de camundongos controles (A), controles tratados com probioticos por 5 semanas (B), obesos (C) e obesos tratados com probioticos por 5 semanas (D) (escala de 100 µm). Micrografias são representativas de 6 animais por grupo.

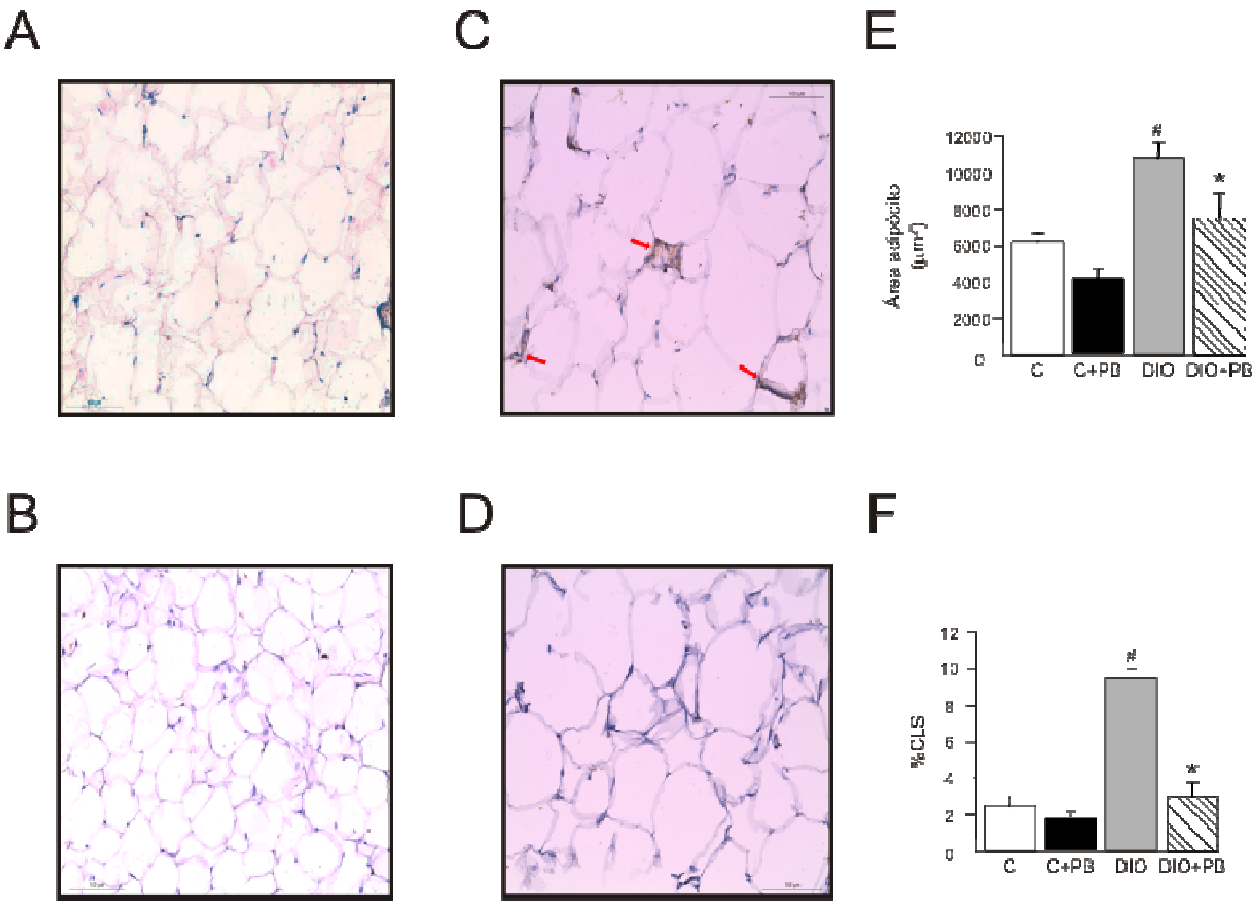


Figura 14. Caracterização morfológica de amostras de tecido adiposo epididimal. A-D, representativo de coloração imunohistoquimica de seções histológicas de 5µm de gordura epididimal usando o marcador específico de macrófago F4/80+ em camundongos controles (A), controles tratados com probióticos por 5 semanas (B), obesos (C) e obesos tratados com probióticos por 5 semanas (D) (escala de 100 µm); E, quantificação da área de adipocitos (μm^2) dos animais; F, prevalência de estruturas *crown-like*. Setas indicam estruturas *crown like* através da detecção por F4/80+. Micrografias são representativas de 6 animais por grupo. Cada barra do gráfico são resultado da media $\pm$ DP de 6 animais por grupo. * $p<0,05$ comparado com DIO e # $p<0,05$ comparado com controle.

4.8 Efeitos do tratamento com probióticos no controle da ingestão energética e na inflamação do hipotálamo

Na obesidade, há uma atenuação das vias de sinalização hipotalâmicas da insulina e leptina, levando à hiperfagia e redução significativa do gasto energético, visto que esses hormônios apresentam funções anorexigênica e termogênica. Nós observamos que a administração de probióticos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica melhorou a resistência à leptina e insulina neste tecido, pois o estímulo com esses hormônios gerou uma redução significativa na ingestão energética no grupo DIO+PB em relação ao grupo DIO (Fig. 15 A, C), além do amento na fosforilação das proteínas IRβ, IRS1 e Akt (via insulina) e JAK2 e STAT3 (via leptina) no hipotálamo (Fig. 15 B, D). O uso de probióticos nesse modelo de obesidade também modulou a expressão de neurotransmissores via diminuição da fosforilação de AMPK e aumento da fosforilação de FOXO, o que resultou no aumento das concentrações de mRNA de POMC e redução nos níveis de mRNA de NPY (Fig. 15 E-H). Esses dados justificam o fato dos animais do grupo DIO+PB ganharem menos peso e terem um consumo energético menor em relação aos camundongos obesos.

Nós avaliamos também o efeito dos probióticos nas principais proteínas da via de sinalização do receptor TLR4, bem como nas concentrações de mRNA de citocinas inflamatórias no hipotálamo. De forma semelhante aos tecidos-alvos de ação clássica da insulina, a administração de probióticos juntamente com a dieta hiperlipídica foi capaz de diminuir a ativação da sinalização do TLR4, diminuindo conseqüentemente a ativação das serina-quinases JNK, IKKβ, a fosforilação de IRS1 em Ser307 e os níveis de iNOS

(Fig. 16 A). Os níveis de mRNA das citocinas IL-6, IL-1β e TNF-α e do TLR-4 também diminuíram de forma significativa (Fig. 16 B-E). Em relação aos camundongos controles, o uso de probióticos não proporcionou mudanças na sinalização do receptor TLR4 no hipotálamo dos controles tratados.

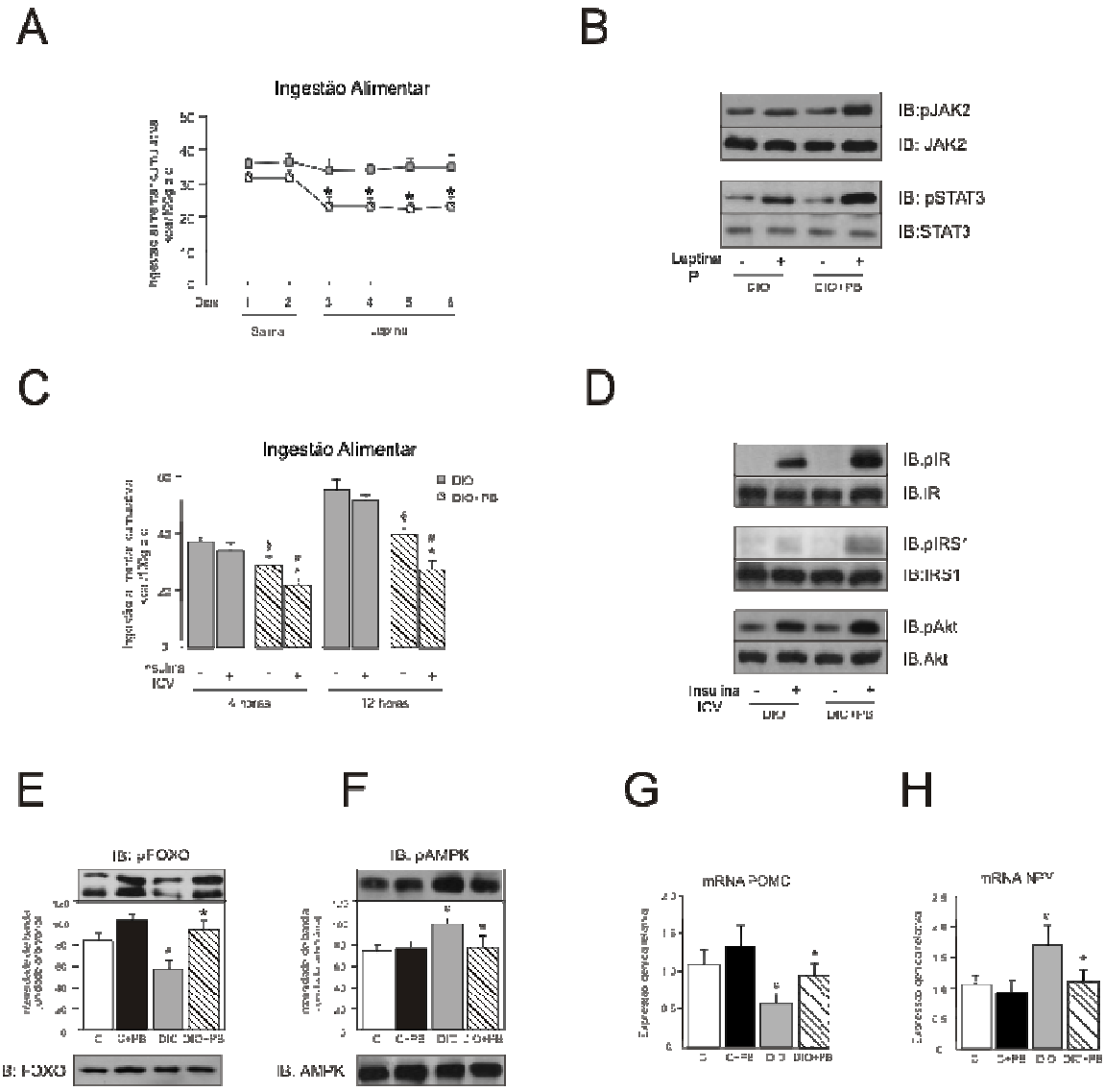


Figura 15. Efeito do uso de probióticos nas vias de sinalização hipotalâmicas de leptina e insulina e no controle da ingestão alimentar. A, ingestão calórica de 4h e 12h depois da infusão intracerebroventricular (ICV) de insulina em camundongos DIO e DIO+PB; B, fosforilação hipotalâmica de Irβ, IRS1 e Akt (blots superiores) e as mesmas proteínas não fosforiladas (blots inferiores), com ou sem estimulo de insulina ICV de animais obesos e obesos tratados com probióticos; C, ingestão energética controlada por 6 dias, sendo que os dois primeiros dias com infusão intraperitoneal (IP) diária de salina e os 4 últimos dias com infusão IP diária de leptina em animais DIO e DIO+PB; D, fosforilação hipotalâmica de JAK2 e STAT3 (blots acima) e as mesmas proteínas não fosforiladas (blots abaixo) de animais DIO e DIO+PB com ou sem estímulo de leptina IP; E, fosforilação hipotalâmica de AMPK em camundongos controles, C+PB, DIO, DIO+PB; F, fosforilaçao hipotalâmica de FOXO1 em camundongos controles, C+PB, DIO, DIO+PB; G e H, níveis de mRNA dos neurotransmissores PMC e NPY em camundongos controles, C+PB, DIO, DIO+PB. Dados de immunoblotting são representativos de 3 experimentos independentes. Dados de qPCR RT e ingestão alimentar são apresentados como media ± DP de 6 animais por grupo. **Para itens A-D:** * p<0,05 comparado com DIO positivo, # p<0,05 comparado com DIO+PB negativo, § p<0,05 comparado com DIO negativo. **Para itens E-H:** * p<0,05 comparado com DIO e # p<0,05 comparado com controle.
IB – immunoblot; p – fosforilado.

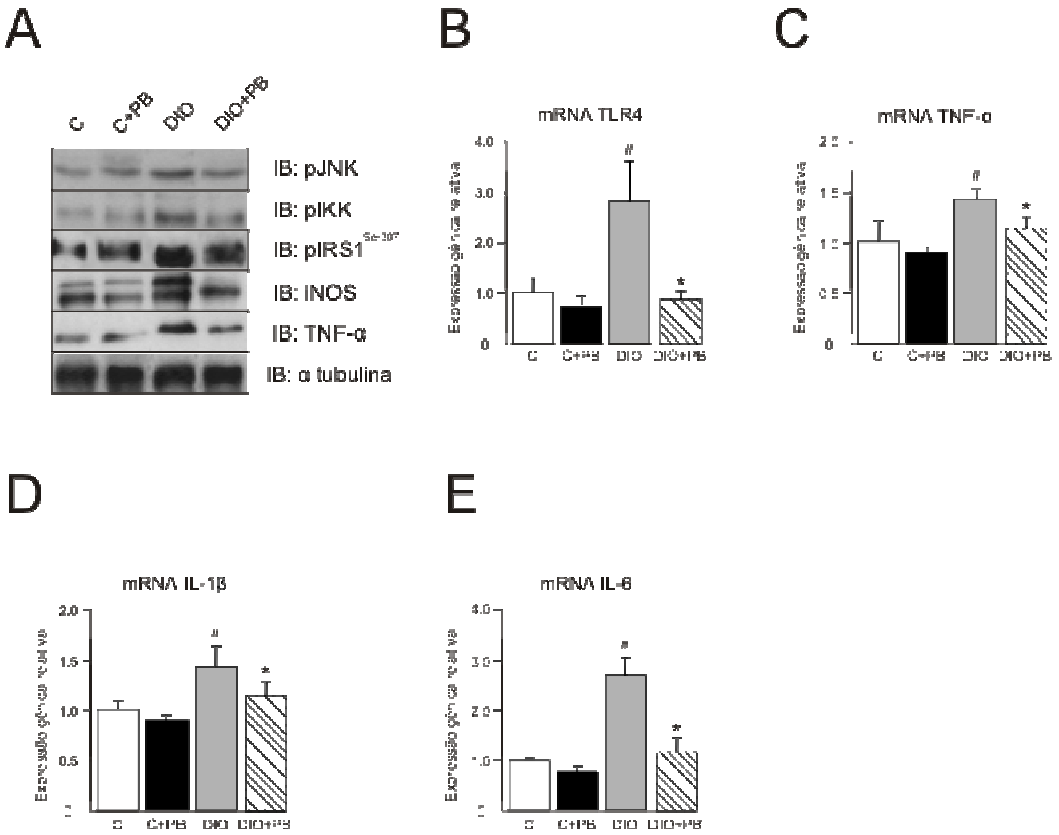


Figura 16. Efeitos dos probióticos nas principais proteínas da via de sinalização TLR4 e nos níveis de mRNA de TLR4 e citocinas inflamatórias no hipotálamo. A, fosforilação de JNK, IKK e IRS1 em serina e proteínas totais iNOS e TNF-α em camundongos controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas, obesos e obesos tratados com probióticos por 5 semanas.. B-E, níveis de expressão gênica relativa de TLR4, TNF-α, IL-1B e IL-6 em animais controles, controles tratados com probióticos por 5 semanas, obesos e obesos tratados com probióticos por 5 semanas. Dados são apresentados como media ± DP de 6 animais por grupo. * p<0,05 comparado com DIO e # p<0,05 comparado com controle.
IB – immunoblot; p – fosforilado.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A inflamação é o principal solo comum entre obesidade e resistência à insulina (RI). Ambas as condições são fatores de risco para diversas doenças e comorbidades, incluindo o diabetes tipo 2. A inflamação da obesidade é caracterizada por um processo inflamatório de baixo grau, porém crônico e que promove diminuições na taxa metabólica basal (17). Desde a década de 1990, muitos trabalhos têm contextualizado o papel da inflamação na obesidade (20-22) e sabe-se que uma forma de tratamento da doença está na modulação de células e moléculas do sistema imunológico. Neste contexto, nosso presente trabalho mostrou que a administração de probióticos concomitantemente com o inicio da dieta hiperlipídica por um período de 5 semanas em camundongos *Swiss* atenuou o desenvolvimento de RI e intolerância à glicose, diminuiu a infiltração de macrófagos em adipócitos, bem como reduziu a expressão e atividade de mediadores inflamatórios acompanhado pela melhora na sinalização da insulina em fígado, músculo, tecido adiposo (TA) e hipotálamo. Observamos também que esses resultados encontrados foram conseqüência principalmente da modulação da microbiota intestinal promovida pelos probióticos, que proporcionou maior integridade da barreira epitelial intestinal e menores concentrações portais de LPS. Face ao exposto, sugere-se que o uso de probióticos pode ser uma forma de prevenir e tratar a obesidade e suas comorbidades, por melhorar a sensibilidade à insulina e modular marcadores inflamatórios de forma benéfica.

A microbiota intestinal é atualmente um grande objeto de estudo para os pesquisadores de diversas áreas, incluindo a obesidade. Hoje sabe-se que tanto animais como seres humanos podem apresentar uma microbiota obesogênica que é capaz, do

ponto de vista metabólico, de extrair mais energia da dieta e, do ponto de vista imuno-funcional, alterar a permeabilidade intestinal, permitindo a translocação de bactérias e fragmentos de bactérias para a circulação sanguínea (49,65). Um desses fragmentos que ganham destaque é o LPS, pois é capaz de ativar um dos principais receptores do sistema imunológico envolvido com mecanismos moleculares de RI: o TLR4. A ligação do LPS a esse receptor ativa duas serina-quinases, JNK e IKKβ, que são responsáveis pela atenuação da via de sinalização da insulina em seus tecidos-alvos (39).

De forma semelhante, nós verificamos que o consumo de dieta hiperlipídica proporciona aumento de permeabilidade intestinal, por diminuição da expressão ileal de proteínas de *tight-junctions* (ZO-1 e Ocludina). Como conseqüência, observamos também que os animais obesos apresentaram concentrações portais de LPS superiores aos camundongos controles, que foram suficientes para ativar TLR4 e fosforilar de JNK e IKKβ. A ativação dessas serina-quinases resultou em RI, observada pelo aumento da fosforilação no resíduo Ser307 do IRS-1 em fígado, músculo, TA e hipotálamo. Entretanto, o uso de probióticos conjuntamente ao consumo da dieta hiperlipídica proporcionou expressão de proteínas de *tight-junctions* em concentrações semelhantes aos controles, o que provavelmente reduziu os valores portais de LPS e a ativação da via de sinalização do TLR4. Acreditamos que a modulação desses mecanismos moleculares com o uso de probióticos tenha proporcionado a melhora dos parâmetros metabólicos analisados, bem como os valores de fosforilação de importantes proteínas integrantes da via de sinalização da insulina (IR, IRS-1 e Akt), melhorando a resistência ao hormônio sistemicamente. Isso reforça a hipótese de alguns autores que acreditam que a ativação de TLR4 em um cenário de obesidade e dieta hiperlipídica acontece prioritariamente por

LPS e não por ácidos graxos saturados ou ácidos graxos livres, sugerindo que mecanismos de RI podem ter origem no intestino (65,67).

Nossa análise metagenômica da microbiota intestinal de animais DIO mostrou um aumento na prevalência de Bacteroidetes (68,6% DIO vs 52,4% C) e uma leve redução em Firmicutes (27,9% DIO vs 34% C) comparado com os controles. Esse resultado foi similar a outros trabalhos da literatura (57-59), incluindo um trabalho previamente publicado em nosso laboratório (69), mas contradiz os primeiros artigos publicados nessa área (55,56); isto é uma evidência de que o perfil da microbiota intestinal na obesidade é ainda controverso, e é possível que diferenças nos métodos, bem como nas espécies de animais utilizados possam explicar as inconsistências dos dados publicados. Outro filo importante para a homeostasia da microbiota intestinal e que diminuiu no tratamento com dieta hiperlipídica foi o Actinobactéria (1,23% DIO vs 3,7% C). Este filo compreende o gênero *Bifidobacterium*, o qual apresenta diversas bactérias probióticas e com ação anti-inflamatória (47).

Os camundongos DIO submetidos ao tratamento com probióticos apresentaram um perfil de microbiota bem diferente dos animais obesos não tratados. Apesar da manutenção do filo Bacteroidetes (67,6% DIO+PB vs 68,1% DIO), houve uma redução significativa na prevalência de Firmicutes (20,5% DIO+PB vs 28% DIO) e um aumento para níveis semelhantes aos controles de Actinobactéria (3,5% DIO+PB vs 3,7% C vs 1,2% DIO). A modulação no filo Actinobactéria era esperada, pois no mix de probióticos utilizado tinha uma espécie pertencente a esse filo (*Bifidobacterium bifidum*). A ausência de alterações na prevalência de Bacteroidetes nos permitiu realizar uma análise mais detalhada dos gêneros pertencentes a esse filo, o que nos mostrou diferenças

significativas. O gênero *Bacteroides* aumentou consideravelmente com o tratamento com probióticos (42% DIO+PB vs 10% DIO). Esse gênero apresenta atividades benéficas ao hospedeiro, pois inclui espécies que aumentam a lipólise no TA e a produção intestinal de GLP-1, além de diminuir a inflamação intestinal e a produção endógena de colesterol (86). De destaque, Round e Mazmanian (87) descreveram que a espécie *Bacteroides fragilis* pertencente a esse gênero produz uma resposta anti-inflamatória no hospedeiro por induzir a diferenciação de células TCD4+ em células Treg localmente, no intestino, na circulação e também no tecido adiposo. Sabe-se que células Treg são grandes produtoras da citocina anti-inflamatória IL-10 (41). Outro gênero do filo Bacteroidetes que aumentou de forma mais relevante com o uso de probióticos em animais obesos foi o *Alistipes*. Esse gênero já foi associado com resistência ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (88). Sendo assim, observa-se que apesar da prevalência de Bacteroidetes não ter mudado com o uso de probióticos, a qualidade dos gêneros pertencentes a esse filo foi alterada de forma positiva. Possivelmente, os benefícios metabólicos e imunológicos encontrados neste trabalho com o uso de probióticos tenham sido resultado dessa modulação de gêneros dentro do filo Bacteroidetes, aliada ao aumento da concentração de Actinobacterias (Fig. 17).

Os receptores do sistema de reconhecimento de antígenos (PRRs) têm função importante na homeostasia do sistema imunológico no intestino, bem como no reconhecimento de patógenos (para mais detalhes, ver em 41). Em situações de disbiose e inflamação intestinais, dois PRRs têm sua expressão aumentada em enterócitos: NOD-1 e CD-14 (64). Neste estudo, observamos que os animais DIO apresentam maior expressão desses receptores no íleo, enquanto a administração de bactérias probióticas reduz a

presença desses PRRs no intestino. Sendo assim, em situações de obesidade, o uso de probióticos, além de modular níveis de inflamação em tecidos insulino-sensíveis, modula também mecanismos de disbiose e ativação imunológica no intestino.

Como descrito anteriormente, a intersecção de estímulos que ativam JNK e IKKβ e condições que promovem RI incluem também citocinas inflamatórias. A ativação de IKKβ inicia a transcrição gênica mediada por NFκB, através da fosforilação e degradação de IκBα, que em certas células promove aumento da síntese de TNFα, IL-6 e IL-1β. Estas, por sua vez, ativam as vias JNK e IKKβ por meio de uma retroalimentação sustentada positiva, levando a um círculo vicioso de sinais inflamatórios subclínicos, o que intensifica o estabelecimento da RI (27). Nossos achados revelam que o tratamento com probióticos não foi apenas capaz de reduzir a fosforilação de IKKβ, mas também a de IκBα e os níveis de TNFα, IL-6 e IL-1β em fígado, músculo e TA, provavelmente via redução da translocação de NFκB para o núcleo. Outro resultado que fortalece tal suposição foi a redução expressiva da expressão de iNOS nos três tecidos clássicos de ação da insulina e no hipotálamo. O NFκB age como um dos mais importantes fatores de transcrição na expressão gênica da iNOS em experimentos *in vitro* e animais (29,31). Ademais, sabe-se que a iNOS e seu produto NO podem estar envolvidos na patogênese do diabetes tipo 2 ligado à obesidade e que ambas as moléculas estão relacionadas a mecanismos de S-nitrosação de proteínas da via de sinalização da insulina, promovendo RI (32). Por esta razão, a melhora na sensibilidade à insulina também pode estar associada à redução da expressão da iNOS verificada nos tecidos dos animais tratados com probióticos.

Na obesidade, grande parte dos níveis circulantes de citocinas inflamatórias são provenientes do TA, não apenas dos adipócitos, mas principalmente de macrófagos infiltrados neste tecido. Tais células participam intensamente de vias inflamatórias superativadas em indivíduos obesos (13,17). Reciprocamente, a redução da infiltração de macrófagos tem demonstrado diminuir a inflamação local no TA, reforçando sua relevância na gênese da obesidade (23). Este presente trabalho observou, por meio da análise de cortes histológicos de TA, que o tratamento com probióticos em camundongos que consumiam a dieta hiperlipídica promoveu uma redução considerável na infiltração de macrófagos e no tamanho dos adipócitos em relação aos animais obesos. Essas modificações morfológicas, aliadas à redução da expressão de moléculas inflamatórias são fatores que podem justificar, ao menos em parte, o aumento dos níveis circulantes de adiponectina nos animais tratados. Essa adipocina com efeitos anti-inflamatórios é expressa exclusivamente no TA e está reduzida em situações de RI (89).

Outro dado relevante em relação ao TA é que a redução do tamanho dos adipócitos observada em animais obesos tratados com probióticos pode ser, além dos fatores descritos acima, um reflexo do aumento da expressão ileal da Fiaf. Esta proteína é uma inibidora circulante de LPL (lipoproteína lipase), enzima responsável pela hidrólise de triacilgliceróis presentes em VLDL ou Quilomicrons (QM) e posterior absorção dos ácidos graxos livres (AGL) pelo TA (49). Dessa forma, o aumento da expressão de Fiaf pelo tratamento com probióticos provavelmente diminuiu o armazenamento de ácidos graxos no TA.

O acúmulo de lipídios no fígado é uma das características da RI. A doença hepática gordurosa não alcoólica (*Non alcoholic fatty liver disease* – NAFLD) muitas

vezes acompanha adiposidade abdominal e seu espectro patológico pode evoluir de uma simples esteatose para esteato-hepatite, fibrose avançada e cirrose (19). A inflamação tem sido claramente reconhecida por desempenhar papel fundamental na progressão dessa doença. Além disso, trabalhos que avaliam a disbiose intestinal induzida por dieta, mostram que a permeabilidade intestinal se correlaciona com a severidade da esteatose hepática (90). Isso ocorre possivelmente pela presença marcante de LPS no fígado, além de outros subprodutos bacterianos potencialmente hepatotóxicos, como: amônia, fenóis e etanol (47). Sabe-se que indivíduos obesos apresentam uma maior quantidade de etanol expirado em relação aos magros, o que enfatiza a presença de uma microbiota mais hepatotóxica na obesidade (91). Em adição, em situações de disbiose intestinal, eleva-se a degradação da colina dietética a dimetilamina e trimetilamina pelas bactérias intestinais. Essas substâncias são tóxicas ao nosso organismo e a deficiência de colina no fígado diminui a formação e exportação de VLDL, gerando acúmulo intra-hepático de gordura (92). Neste contexto, nosso estudo revelou que, enquanto nos cortes histológicos de fígado de camundongos DIO detectou-se um grande numero de vesículas de gordura amplamente distribuídas pelo parênquima, os animais tratados com probióticos e alimentados com a mesma dieta apresentaram parênquima muito semelhante ao dos controles, sem qualquer evidência de esteatose. Esses resultados corroboram com o que se tem descoberto até o momento sobre alterações morfológicas hepáticas induzidas pela disbiose intestinal da obesidade.

Uma questão intrigante que encontramos foi o fato dos animais tratados com probióticos e que consumiram dieta hiperlipídica ganharem menos peso e ingerirem menos calorias em relação aos camundongos que receberam a mesma dieta. Isso nos

levou a buscar resultados relacionados aos mecanismos centrais de controle da fome e termogênese. O hipotálamo é o centro de controle da homeostase energética e ingestão alimentar. Ele controla esses processos via informações da periferia coordenadas por nutrientes, hormônios e sistema nervoso autônomo. Essas informações são integradas primeiramente no núcleo arqueado, que é o centro de primeira ordem do hipotálamo, pelos neurônios POMC (pro-opiomelanocortina) e NPY (neuropeptídeo Y). Esses neurônios projetam axônios para os núcleos hipotalâmico lateral e paraventricular e controlam a ingestão alimentar (93). Os hormônios leptina e insulina apresentam papel fundamental nesse controle, ativando a neurotransmissão anorexigênica via POMC e inibindo neurônios orexigênicos NPY no núcleo arqueado. Na obesidade, existe resistência hipotalâmica à leptina e insulina, induzindo mecanismos centrais de hiperfagia e reduzido gasto energético. Estudos em animais e humanos mostram que isso acontece por um processo inflamatório no hipotálamo que desregula a ação de proteínas como FOXO e AMPK, proporcionando um desequilíbrio nos neurônios que controlam a fome e a termogênese (94). Neste sentido, nós demonstramos pela primeira vez, que o uso de probióticos em um modelo experimental de obesidade diminuiu a expressão de marcadores inflamatórios no hipotálamo e melhorou as vias de sinalização da leptina e insulina, refletindo em aumento das concentrações de mRNA de POMC e redução de mRNA de NPY e conseqüentemente menor ingestão alimentar.

Sabe-se que existe uma conexão cérebro-intestino muito importante e o eixo cérebro-intestino-microbiota já foi descrito em trabalhos que estudaram depressão e estresse (95,96). Entretanto, o controle central da microbiota no metabolismo ainda não foi descrito. Nossos dados mostraram que os níveis da incretina anorexigênica GLP-1

está reduzida em animais obesos em relação aos controles; porém, o uso de probióticos nesses animais restaura esse níveis para valores muito próximos dos controles, sugerindo outro mecanismo pelo qual o uso de probióticos diminui a ingestão alimentar. A expressão intestinal de GLP-1 é induzida principalmente por produtos de fermentação de bactérias benéficas, como AGCC, que em enterócitos ligam-se a receptores GPR-43 e ativam a transcrição de pro-glucagon, precursor de GLP-1 (53,97). Em nosso trabalho, os probióticos aumentaram a expressão intestinal de pro-glucagon, o que reforça sua modulação em enterócitos para aumentar os níveis circulantes desta incretina. Em estudos futuros, pretendemos investigar se a microbiota intestinal também age via nervo vago para se "comunicar" com o hipotálamo e induzir sinais anorexigênicos no mesmo.

Em resumo, nossos dados comprovam que a microbiota intestinal é uma moduladora-chave das vias inflamatórias e metabólicas. Acreditamos que o uso de probióticos possa ser uma ferramenta importante no tratamento de pacientes com obesidade e RI, mas sabemos que mais estudos precisam ser desenvolvidos, especialmente pesquisas que aprofundem o conhecimento da microbiota humana no contexto saúde-doença para que possam ser desenvolvidas cepas probióticas mais específicas para o tratamento de doenças metabólicas, como a obesidade.

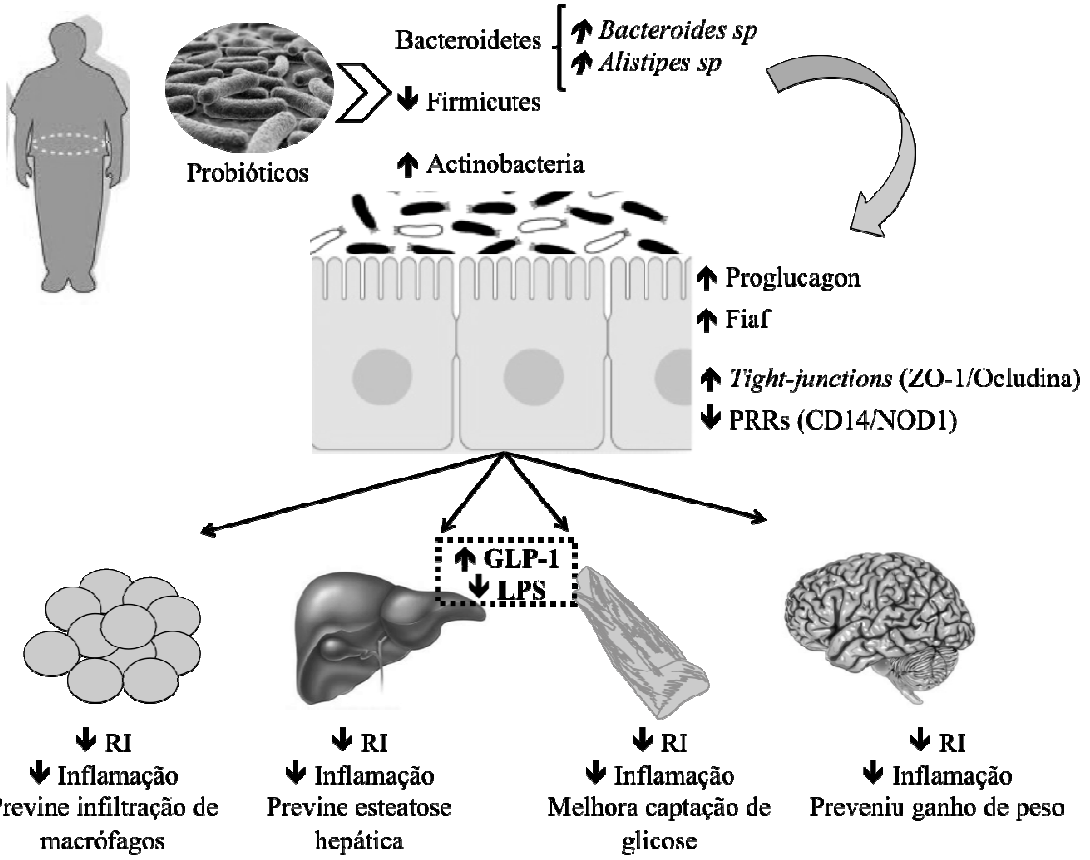


Figura 17. Mecanismo proposto pelo qual os probióticos melhoram a homeostasia da glicose e resistência à insulina. A modulação nos filos e em alguns gêneros da microbiota intestinal promovida pelo uso dos probióticos por 5 semanas nos animais que consumiram dieta hiperlipídica proporcionou diminuição da inflamação intestinal e melhora da permeabilidade das células do epitélio ileal. Nas células intestinais, ainda houve aumento da expressão de proglucagon e fiaf, os quais são grandes moduladores metabólicos. Como resultado, níveis séricos de LPS reduziram e os de GLP-1 aumentaram, melhorando a inflamação e ação da insulina em fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e hipotálamo.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O uso de probióticos em um modelo experimental de obesidade atenuou diversos parâmetros associados à inflamação e resistência à insulina em tecidos insulino-sensíveis. Nesse modelo experimental, o tratamento com probióticos preveniu o desenvolvimento de esteatose hepática e infiltração de macrófagos no TA. Também houve uma modulação hipotalâmica em neurotransmissores que controlam a fome e saciedade, diminuindo o ganho de peso e o consumo energético.

Os mecanismos pelos quais os probióticos conferiram esses benefícios foram principalmente pela sua ação local no intestino, reduzindo a translocação de LPS e aumentando a produção ileal de GLP-1, além de melhorar a qualidade da microbiota intestinal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO | Obesity and overweight [Internet]. [citado em 2013 Abr 10]. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html.

2. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. Nature. 2000;404(6778):635-43.

3. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. Int J Obes (Lond). 2008;32(9):1431-7.

4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: despesas, rendimento e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

5. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2012;380:2224-60.

6. Haslam D. Obesity: a medical history. Obes Rev. 2007;8(Suppl 1):31-6.

7. Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A. Obesity and the skin: Skin physiology and skin manifestations of obesity. J Am Acad Dermatol. 2007;56:901-16.

8. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. Hum Reprod update. 2013;19(3):221-31.

9. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, Danaei G, Lin JK, Finucane MM et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. Population Health Metrics 2012; 10: 22.

10. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. Front Med. 2013;7(1):14-24.

11. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus - present and future perspectives. Nat Rev Endocrinol. 2012;8:228-36.

12. Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes. 1994;43:1066-84.

13. Cancello R, Clément K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. BJOG 2006; 113:1141-7.

14. Carvalheira JBC, Ribeiro EB, Araújo EP, Guimarães RB, Telles MM, Torsoni M et al. Selective impairment of insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats. Diabetologia. 2003;46:1629-40.

15. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. 2008;454:428-35.

16. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006;444:860-7.

17. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Rev Immunol. 2011;29:415-45.

18. Lehrke M, Lazar MA. Inflamed about obesity. Nat Med. 2004;10:126-7.

19. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest. 2006;116(7):1793-801.

20. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993;259(5091):87-91.

21. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. Science. 2001; 293(5535):1673-7.

22. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, GoÅNrgün CZ, Uysal KT, Maeda K et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature. 2002;420(6913):333-6.

23. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. Annu Rev Physiol. 2010;72:219-46.

24. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Cow CJ et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Investig. 2003;112:1821-30.

25. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 1998;9:89-109.

26. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. Arq Bras Endocrinol Metab. 2002;46:419-25.

27. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress and diabetes. J Clin Invest. 2005;115:1111-9.

28. Zick Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003; 27(Suppl. 3):S56-S60.

29. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappaB/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1994;269:4705-8.

30. Elizalde M, Rydén M, van Harmelen V, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C et al. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. J Lipid Res. 2000;41:1244-51.

31. Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. Diabetes. 2002;51:1076-82.

32. Carvalho-filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JBC, Oliveira MG et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt. Diabetes. 2005;45:959-67.

33. Fernadez-Real J, Pickup JC. Innate Immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. Trends Endocrinol Metab. 2007;19:10-6.

34. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell. 1996;86:973-83.

35. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. J Biol Chem. 1999;274:10689-92.

36. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol. 2001;2:675-80.

37. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. J Clin Invest. 2006;116:3015-25.

38. 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;56:1986-98.

39. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008;42:145-51.

40. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. Pharmacol Ther. 2011;130:202-12.

41. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota - masters of host development and physiology. Nature Rev. 2013;11:227-38.

42. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell. 2012;148:1258-70.

43. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease.

Physiol Rev. 2010;90: 859-904.

44. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010;464:59-65.

45. Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and the gut microbiota. Gastroenterology. 2009;136:1476-83.

46. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. Diabetes. 2010;59:3049-57.

47. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature. 2012;489:242-9.

48. Pedersen R, Andersen AD, Mølbak L, Stagsted J, Boye M. Changes in the gut microbiota of cloned and non-cloned control pigs during development of obesity: gut microbiota during development of obesity in cloned pigs. BMC Microbiology. 2013;13:30.

49. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(44):15718-23.

50. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:15451-5.

51. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:979-84.

52. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Bäckhed F, Manchester JK et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:16767-72.

53. Le PE, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. J Biol Chem. 2003;278:25481-9.

54. Bjursell M, Admyre T, Goransson M, Marley AE, Smith DM, Oscarsson J et al. Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2 (Ffar2) deficient mice fed a high fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011;300:E211-E220.

55. Turnbaugh, PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An

obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444: 1027-31.

56. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:11070-5.

57. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. Am J Clin Nutr. 2008;88: 894-9.

58. Schwiertz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. Obesity. 2010;18:190-5.

59. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T et al. Inflammasome mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. Nature. 2012;482:179-85.

60. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:2365-70.

61. Turnbaugh, PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon, JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host Microbe 2008;3:213-23.

62. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. Gastroenterology. 2009;137:1716-24.

63. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. Sci Transl Med. 2009;1(6):6ra14.

64. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermudéz-Humarán LG et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. EMBO Mol Med. 2011;3:559-72.

65. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2007;10:729-34.

66. Erridge C, Samani NJ. Saturated fatty acids Do Not directly stimulate toll-like receptor signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(11):1944-9.

67. Murumalla RK, Gunasekaran MK, Padhan JK, Bencharif K, Gence L, Festy F et al. Fatty acids do not pay the toll: effect of SFA and PUFA on human adipose tissue and

mature adipocytes inflammation. Lipids Health Dis. 2012;11:175.

68. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007;56:1761-72.

69. 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.

70. Dom S, Droste JH, Sariachvili MA, Hagendorens MM, Oostveen E, Bridts CH et al. Pre- and post-natal exposure to antibiotics and the development of eczema, recurrent wheezing and atopic sensitization in children up to the age of 4 years. Clin Exp Allergy. 2010;40(9):1378-87.

71. Stecher B, Maier L, Hardt WD. 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. Nat Rev Microbiol. 2013;11(4):277-84.

72. Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. Neurogastroenterol Motil. 2011;23(3):187-92.

73. Food and Agriculture Organization (FAO) and World Health Organization (WHO), *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*, 2001.

74. Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(3):a010074.

75. Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. Curr Opin Biotechnol. 2006;17:204-10.

76. Nissle A. Explanations of the significance of colonic dysbacteria & the mechanism of action of E. coli therapy (mutaflor). Medizinische. 1959;4:1017-22.

77. Sanz Y, Santacruz A, Gauffin P. Session 8: Probiotics in the defence and metabolic balance of the organism. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. Proc Nutr Soc. 2010;69:434-41.

78. Vyas U, Ranganathan N. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond. Gastroenterol Res Prac. 2012;2012:872716.

79. Simons LA, Amansec SG, Conway P. Effect of Lactobacillus fermentum on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006;16:531-5.

80. Greany KA, Bonorden MJ, Hamilton-Reeves JM, McMullen MH, Wangen KE, Phipps WR et al. Probiotic capsules do not lower plasma lipids in young women and men. Eur J Clin Nutr. 2008;62:232-7.

81. Jung SP, Lee KM, Kang JH, Yun SI, Park HO, Moon Y et al. Effect of Lactobacillus gasseri BNR17 on Overweight and Obese Adults: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial. Korean J Fam Med. 2013;34(2):80-9.

82. Reeves PG. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. J Nutr. 1997;127:838S-841S.

83. Schenka AA, Machado CM, Grippo MC, Queiroz LS, Schenka NG, Chagas CA et al. Immunophenotypic and ultrastructural validation of a new human glioblastoma cell line. Cell Mol Neurobiol 2005;25:929–941

84. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods. 2007;69(2):330-9.

85. Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. J Biol Chem. 2006;281(28):18933-41.

86. Martinez I, Wallace G, Zhang C, Legge R, Benson AK, Carr TP et al. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. Appl Environ Microbiol. 2009;75:4175-84.

87. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature Rev Immunol. 2009;9:313-23.

88. Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Bergé M, Cenac C et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. Gut. 2012;61(4):543-53.

89. Calton EK, Miller VS, Soares MJ. Factors determining the risk of the metabolic syndrome: is there a central role for adiponectin? Eur J Clin Nutr. 2013; 67(5):485-91.

90. Machado MV, Cortez-Pinto H. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. Ann Hepatol. 2012;11(4):440-9.

91. Nair S, Cope K, Risby TH, Diehl AM. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Am J Gastroenterol. 2001;96:1200-4.

92. Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, Fischer LM, Zeisel SH, Fodor AA. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty

liver with choline deficiency. Gastroenterology. 2011;140:976-86.

93. Sasaki T, Kitamura T. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake. Endocrine J. 2010;57(11):939-46.

94. Sande-Lee SV, Velloso LA. Disfunção hipotalâmica na obesidade. Arq Bras Endocrinol Metab. 2012;56(6):341-50.

95. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. Gastroenterology. 2011;141:599-609.

96. Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108: 3047-52.

97. Holst JJ. Glucagon and glucagon-like peptides 1 and 2. Results Probl Cell Differ. 2010;50:121-35.

8. APÊNDICE

PROBIOTICS IMPROVE INSULIN SENSITIVITY IN DIO MICE VIA INTESTINAL PERMEABILITY AND MICROBIOTA MODULATIONS

Renata A Bagarolli, Natália Tobar, Bruno M Carvalho, Gustavo Pimentel, Guilherme Z Rocha, Alexandre G Oliveira, Dioze Guadagnini, José B C Carvalheira, Sara T O Saad, Mario J A Saad

Department of Internal Medicine, State University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

Please address correspondence to: Mario J. A. Saad, M.D., Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil, 13081-970, Fax: +55 19 3521-8950, e-mail: msaad@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

OBJECTIVE - Obesity is the main risk factor to the development of insulin resistance and type 2 diabetes. The common basis among these events is an inflammatory process characterized by the activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by its main ligand lipopolysaccharide (LPS). Its concentration is higher in obese people and it is believed that changes in composition of the gut microbiota and epithelial functions may play a role in the inflammation associated with obesity. The aim of the study was to evaluate the effects of probiotics treatment on the insulin sensitivity, TLR4 signaling, intestinal permeability, microbiota composition and central food intake regulation in diet-induced obese (DIO) mice.

RESEARCH DESIGN AND METHODS - Swiss mice were submitted to a high-fat diet or chow with probiotics or vehicle for 5 weeks. Metagenome analyses were performed on DNA samples from mouse faeces. Blood was collected to determine levels of glucose, insulin, LPS, cytokines and GLP-1. Liver, muscle, ileum, hypothalamus and adipose tissue proteins were analyzed by western blotting and Real time PCR. In addition, liver and adipose tissue were analyzed using histology and immunohistochemistry.

RESULTS – The high-fat diet (HFD) promoted huge alterations in gut microflora that reflected in increased intestinal permeability, LPS translocation, TLR-4 activation and systemic low-grade inflammation, resulting in decreased glucose tolerance and a hyperphagic behavior. All these obese related features were reversed by changes in the gut microbiota profile induced by probiotics in mice subjected to a HFD.

CONCLUSIONS – Our data demonstrate that the intestinal microbiota is a key

modulator of inflammatory and metabolic pathways. We believe that probiotics can be an important tool to prevent and treat patients with obesity and insulin resistance.

INTRODUCTION

Insulin resistance, obesity and type 2 diabetes are metabolic disorders resulting from a combination in variable association of genetic and environmental factors (1). The latter include mainly a dramatic change in dietary habits, characterized by an increased intake of lipids, which has been suggested to be responsible for the considerable rise in such metabolic diseases through mechanisms that include low-grade inflammation (2,3). In this context, the toll-like receptor 4 (TLR4) is one of the major molecules of the innate immune system involved in molecular mechanisms of insulin resistance, because of its capacity to activate serine kinases proteins, such as c-Jun-N-terminal kinase (JNK) and the inhibitor kinase-κB (IKK) (4). The incitement of these two molecules causes serine residue phosphorylation on the insulin receptor (IR) and IR substrate 1 (IRS-1), reducing the IR binding ability and contributing to the deregulation of insulin signaling (5-7).

The main ligand of TLR4 is the most antigenic component of gram-negative bacterial wall, lipopolyssacharide (LPS) (8). Its concentration is increased in obese people and mice fed a high-fat diet (HFD), which characterizes the metabolic endotoxemia of insulin resistance (9). In this sense, the gut has emerged as the most possible source of this bacterial fragment, leading to metabolic disturbances. In fact, it is known that HFD can cause imbalances in the gut microbiota composition and in the intestinal epithelial layer integrity (10). Besides, the gut microbiota also help to digest otherwise indigestible food components and regulate host fat storage genes, thus regulating host energy homeostasis (11). The last mechanism is related to the suppression of intestinal fasting-induced adipose factor (FIAF), which is a liprotein lipase (LPL) inhibitor that limits adipocyte uptake of fatty acids and triacylglycerol accumulation (11).

Many are the strategies proposed to regulate those imbalances in gut microbiota composition (also known as intestinal dysbiosis) in obesity, such as the use of antibiotics, prebiotics and probiotics (12-15). The latter, whose definition is live microbial food supplements which help maintain the balance of intestinal microflora (16), have shown in some studies to be effective in the treatment of insulin resistance in both rodents and humans, however, the deep mechanisms that lead to such benefits are poorly understood (17,18).

In the current study, we evaluated the effects of probiotics on gut microbiota and permeability modulations in HFD and controls animals. More importantly, we investigated the effects of these gut modulations on TLR4 signaling, on insulin sensitivity and signaling and also on hypothalamic control of food intake. Results from our present study may have profound therapeutic implications for the management of insulin resistance and obesity.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Materials

Antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), except for anti-Akt, anti-phosphorylated Akt, anti-phosphorylated AMPK, anti-AMPK, anti-α-tubulin and anti-TLR4 were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Human recombinant insulin (Humulin) was purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA). The probiotics mixture was purchased from Futureceuticals (Momence, IL, USA). Routine reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), unless otherwise specified.

Animals

Eight-week-old male Swiss mice were obtained from the UNICAMP Central Animal Breeding Centre (Campinas, São Paulo, Brazil). Animals (n=06 per group) were housed in individual cages with free access to water and rodent chow under a 12h light/dark cycle. The mice composed randomly 2 groups: chow diet (C) and high-fat diet (HFD) by 5 consecutive weeks (DIO). During these 5 weeks, some mice of the DIO and C groups received daily a pool of probiotics and they composed the DIO+PB and C+PB groups, respectively. The HFD consisted of 55% of energy derived from fat, 29% from carbohydrates and 16% from protein. All procedures were approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas.

Probiotics administration protocol

The probiotic strains used were *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. During the 5 weeks of treatment, the C+PB and DIO+PB animals received daily a concentration of $6x10^8$ CFU of each strain, resulting in a final concentration of 1.8×10^9 CFU of bacteria. The probiotics were diluted in 300µl of sterile water for gavage. The rest of mice from DIO and C groups received only the vehicle (sterile water).

Intraperitoneal glucose tolerance test

After fasting the mice for 8 h, a glucose tolerance test was performed. Glucose (1 g/kg) was injected intraperitoneally and blood samples were collected from the tail vein at different time points up to 120 min to determine blood glucose and insulin levels.

Hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp

After an overnight fast, mice were anaesthetised and catheterised. A 120 min hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp was carried out with a prime continuous insulin infusion (30 mU kg−1 min−1). Blood glucose was measured at 5 min intervals and glucose (5% wt/vol.) was infused at a variable rate to maintain blood glucose at fasting levels.

Assays

ELISA kits were used to determine insulin (Millipore, St Charles, MO, USA), TNF-α, IL-6 and GLP-1 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

LPS determination

Sterile serum samples, obtained from portal vein blood, were diluted to 20% (vol./vol.) with endotoxin-free water and then heated to 70°C for 10 min to inactivate serum proteins. LPS was quantified using a commercially available Limulus Amebocyte Assay (Cambrex, Walkersville, MD, USA), according to the manufacturer's protocol.

Tissue extraction, immunoprecipitation and protein analysis by immunoblotting

Mice fasted for 12h were anaesthetised, the abdominal cavity was opened, the vena cava exposed and NaCl (0.9% wt/vol.) solution or insulin (10^{-6} mol/l) was injected. Liver, hypothalamus, ileum, muscle and adipose tissue were removed, minced coarsely and homogenized in specific extraction buffer. Tissue extracts were incubated overnight with myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) antibody and immunoprecipitated using protein A Sepharose 6MB (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The immunoprecipitates and whole-tissue extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with specific antibodies. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (SupersignalWest Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific).

Real-time PCR

Total RNA was obtained from liver, hypothalamus, ileum, gastrocnemius muscle and epididymal adipose tissue of the four groups of mice according to the methods published previously (19). For tissue samples, first-strand cDNA was synthesized using SuperScript II reverse transcriptase and random hexamer primers as described in the

manufacturer's protocol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Real-time detection of PCR amplification was performed in an ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) using SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Twenty ng of each cDNA sample were used in the reaction with the primers described in Supplementary Table 1. GAPDH expression was used as endogenous control and samples from control mice were used as calibrators. A negative "No Template Control" was also included for each primer pair. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-specific amplification. Two replicas were run on the same plate for each sample. Results are expressed as relative expression values.

Metagenome profile

Faecal samples were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until use. At this time, DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified. The extracted DNA from each sample was used as the template to amplify the V2-V3 regions of 16S rRNA genes. PCR amplification, pyrosequencing of the PCR amplicons, and quality control of raw data were performed as described previously (20). Samples were then sequenced in GS FLX Titanium using the GS FLX Titanium PicoTiterPlate Kit combined with the GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The readouts obtained from the sequencing were analyzed by bioinformatics using basic local alignment search tool X (BLASTX), observed with METAREP software, and compared according to phylum prevalence among groups.

Liver and adipose tissue histology

Liver and epididymal white adipose tissue were dissected and fixed by immersion in 4% (wt/vol.) paraformaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4 for 24 h, dehydrated, cleared and then embedded in paraffin. Sections (5 μm) were obtained and stained by haematoxylin and eosin to assess morphology. Tissue analyses were performed blinded by an expert pathologist (AAS). Adipose tissue was evaluated by crown-like structure (CLS) density (average CLS number within ten high-power fields per animal) and mean adipocyte surface area, using Imagelab Analysis software, as previously described (21).

Adipose tissue immunohistochemistry

Tissue sections, 5 μm, were mounted on silanised glass slides, processed and incubated with epidermal-growth-factor-like modulecontaining mucin-like hormone receptor-like 1 (F4/80) primary antibody, as previously described (22) Antibody staining was performed using an IHC-peroxidase kit (Advance HRP, Dako CytoMation, Carpinteria, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Three different high-power fields from three different sections were evaluated blinded by an expert pathologist (AAS). The total number of nuclei of F4/ 80-expressing cells was counted for each field and the area occupied by these cells was measured.

Intracerebroventricular (ICV) Cannulation

For both insulin signaling study in the hypothalamus, the Swiss mice were stereotaxically instrumented under intraperitoneal injection of a mix of ketamin (10 mg) and diazepam (0.07 mg) (0.2 ml/100 g body weight) with a chronic 26-gauge stainless

steel indwelling guide cannula aseptically placed into the third ventricle at the midline coordinates of -1.8 mm posterior to the bregma and 5.0 mm below the surface of the skull of mice, as previously described (23).

Insulin ICV Injections

Swiss mice were deprived of food for 2 hr with free access to water and received ICV infusion of vehicle or insulin (200 mU in 2μL; Eli Lilly and Company, Indianápolis, EUA) at 6:00 p.m. to evaluate the food intake. Food intake was determined by measuring the difference between the weight of chow and HFD given and the weight of these diets at the end of a 4, 12 or 24-h period. For hypothalamic analysis of the insulin signaling, the Western Blotting was performed, and the insulin was injected fifteen minutes before of the hypothalamic tissue extraction.

Leptin Intraperitoneal (IP) Injections

After five weeks of treatment, five mice from each group received an IP injection of leptin recombinat (3 mg/kg body weight; Calbiochem®, San Diego, CA, USA) or saline at the 6:00 p.m., as previously described (24) by five consecutive days. Body weight and food intake were measured daily after the leptin injection. For hypothalamic analysis of the leptin signaling, the Western Blotting was performed, and the leptin was IP injected 45 minutes before of the hypothalamic tissue extraction.

Food Intake Determination

ICV or IP treatments were performed between 5:30 and 6:00 p.m. Thereafter, the diets were given to four groups and food intake was determined by measuring the difference between the weight of diet given and the weight of diet at the end of a 4, 12 or 24-h period.

Statistical Analysis

Data are expressed as means ± SEM and the number of independent experiments is indicated. The results of blots are presented as direct comparisons of bands or spots in autoradiographs and quantified by optical densitometry (Scion Image; Scion Corporation, Frederick, MD). For statistical analysis, the groups were compared using a 2-way ANOVA with the Bonferroni test for post hoc comparisons. The level of significance adopted was $p<0.05$.

RESULTS

Physiologic and metabolic parameters

Figure 1 shows comparative data regarding the controls (C), controls treated with probiotics for 5 weeks (C+PB), diet-induced obesity mice (DIO) and DIO mice treated with probiotics for 5 weeks (DIO+PB). All animals of control groups, treated or not, presented similar body weight and epididymal fat pad weight. However, with regard to DIO groups, the treatment with probiotics provided a markedly decrease in these parameters (Fig. 1A and B). Similar modulations were also found for fasting insulin and glucose values (Fig. 1C and D). After 5 weeks of probiotics treatment, adiponectin serum levels were similar between the control groups, but a significant increase was observed in DIO+PB group compared with DIO animals (Fig. 1G).

To investigate glucose tolerance, we performed an intraperitoneal glucose tolerance test (GTT) and determined serum glucose and insulin levels at determined time points. Throughout the test, glucose and insulin levels of DIO animals were higher at the all time points. Conversely, DIO+PB mice showed an improved glucose and insulin profiles, which were closer to the control group profile (Fig. 1E, F, H and I). Mice that received a high-fat diet (HFD) showed a striking reduction in the glucose infusion rate (GIR) measured by the hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp compared with control animals. After probiotic treatment for 5 weeks, the insulin sensitivity was partially restored.

Effects of probiotics treatment on insulin signaling in liver, muscle and adipose tissue

We then examined the consequences that the probiotics administration provoked on the insulin signaling pathway in its main target tissues. As expected, in liver, muscle and adipose tissue of mice fed on HFD, insulin-stimulated tyrosine phosphorylation levels of IRβ and IRS-1 and Akt serine phosphorylation were significantly reduced compared to the control animals (Fig. 2 A-I). Moreover, the groups treated with probiotics exhibited higher phosphorylation of these proteins in all studied tissues when compared to the non treated group, except for the IRS-1 phosphorylation in liver, which exhibited phosphorylation levels similar to DIO non-treated mice (Fig. 2B). There were no differences in the IRβ, IRS-1 and Akt protein expressions among C, C+PB, DIO and DIO+PB groups.

Effects of probiotics treatment on the TLR4 signalling pathway in DIO mice

As expected, the treatment with HFD activated the signaling of the innate immune receptor, TLR4, in liver, muscle and adipose tissue of DIO animals. This fact was observed by the greater interaction of TLR4 with its adaptor protein MyD-88 (Fig. 3 B, D and F). This event resulted in increased JNK and IKKβ activation and IκBα phosphorylation and degradation, consequently enhancing IRS-1 Ser307 phosphorylation, which in turn induced insulin resistance. The activation of TLR4 signaling also provided higher levels of iNOS expression, molecule that generates insulin resistance by S-nitrosation mechanisms (Fig. 3 A, C and E). The administration of probiotics along with the HFD was able to reduce the activation of TLR4 signaling,

reducing the subsequent activation of serine kinases JNK, IKKβ, the phosphorylation of IκBα and IRS1 on Ser307 and levels of iNOS (Fig. 10 A-F). With regard to the control groups, the probiotics treatment did not provided changes on the TLR4 signaling, except for the iNOS protein, that reduced significantly in liver, muscle and adipose tissue of C+PB group in relation to its respective non-treated group (Fig. 10 A, C and E).

Cytokines analyses

We examined TNF-α, IL-6 and IL1-β mRNA expressions in liver, gastrocnemius muscle and epididymal adipose tissue of the studied groups. As expected, cytokine mRNA expressions in DIO mice were higher than in control group (Fig. 4 A-I). The relative amount of TNF-α, IL-6 and IL-1β transcripts were in general significantly reduced in all tissues from DIO+PB animals compared with DIO group (Fig. 4 A-I). In addition, the serum TNF-α and IL-6 levels showed increases in untreated mice given the HFD compared with the control group, and probiotics treatment blocked these increases in cytokine level (Fig. 3 G and H).

Effects of probiotics treatment on gut microbiota

The metagenomic sequencing analysis from faeces of all groups showed profile changes between rodents of each study group. Among the control mice, treatment with probiotics increased the prevalence of Firmicutes and Actinobacteria and decreased the presence of Bacteroidetes compared to untreated animals. In addition, considering mice fed chow and the HFD, there was a considerable increase in the prevalence of Bacteroidetes and a decrease in the Firmicutes and Actinobacteria phylum in DIO animals compared with control mice. Finally, the administration of probiotics in obese

animals provided a continued presence of Bacteroidetes, an increase in the prevalence of Actinobacteria and a reduction in the phylum Firmicutes compared to untreated obese mice. The probiotics also promoted an increased variety of phyla presented in these animal feaces (Fig. 5 A-D).

The figure 5 still shows the distribution of some genera of Bacteroidetes and Firmicutes phyla in DIO and DIO+PB groups. Despite probiotics treatment have not changed the prevalence of Bacteroidetes in animals on a HFD, there was a major change in the concentration of some genera, such as *Bacteroides* and *Alistipes,* that increased in a significant way compared to untreated obese animals. With regard to the Firmicutes phylum, the DIO+PB presented a reduction of the *Robinsoniella* and *Riminococcus* genera prevalence compared with the group DIO (Fig. 5 E and F).

Effects of probiotics treatment on gut metabolic and immunologic homeostasis

We then examined the consequences that the changes in gut microbiota provoked on tight-junctions proteins and on important proteins of immune system that are situated in the ileum. With regard to the intestinal permeability, the two most important tight-junctions proteins, ZO-1 and Occludin, were reduced in DIO animals compared with controls, whereas the administration of probiotics in HFD mice restored partially the expression of these proteins (Fig. 6 D and E). As a consequence of these changes, obese mice also showed increased levels of LPS in their portal circulation compared with the control group; this was prevented by probiotics treatment (Fig. 6 H). In addition, the main molecules involved in gut microbiota inflammation and bacterial translocation, NOD-1 and CD-14, had their expression increased in ileum of DIO animals and the treatment

with probiotics reversed this negative modulation (Fig. 6 C and F).

The probiotics treatment in HFD animals still increased the ileum expression of fasting-induced adipose factor (Fiaf) and pro-glucagon mRNAs and the serum levels of GLP-1 compared with obese non-treated mice, providing important systemic metabolic modulations (Fig. 6 A, B and G).

Considering all animals of control groups, treated or not, no significant differences were found between the gut parameters analyzed (Fig. 6 A-H).

Effects of probiotics treatment on histology in liver and macrophage infiltration in adipose tissue

Histological sections from liver of DIO group showed the presence of innumerous fat vesicles compared to the control ones, which characterizes the first group as presenting hepatic steatosis. Nevertheless, the treatment with probiotics induced no more fat accumulation in liver parenchyma (Fig. 7 A-D).

Morphologic analysis of epididymal fat pad revealed significant differences on adipocyte size from DIO groups compared to control groups. However, between the DIO groups, we observed that the treatment with probiotics reduced the area of the adipocytes significantly, but still far from the values of the controls animals. The HFD provided a huge macrophage infiltration in the adipose tissue, determined by the F4/80+ staining, but the administration of probiotics decreased such infiltration as well as the number of crown-like structures, which were abundant in DIO animals (Fig. 7 E-J).

Effects of probiotics treatment on insulin and leptin sensitivity and on inflammatory molecules in the hypothalamus

In obesity, there is an attenuation of insulin and leptin hypothalamic signaling pathways, leading to hyperphagia and a significant reduction in energy expenditure, since these hormones have strong anorexigenic and thermogenic functions. We have observed, for the first time, that the administration of probiotics in mice fed HFD improved leptin and insulin resistances in this tissue, whereas these hormones stimulations produced a significant reduction in energy intake in DIO+PB group compared with the DIO group (Fig. 8 C and D), and the increase in the phosphorylation of IRβ, IRS1 and Akt (insulin signaling) and JAK2 and STAT3 (leptin signaling) in the hypothalamus (Fig. 8 E and F). The probiotics administration in this obesity model also modulated the expression of neurotransmitters via reduction of AMPK phosphorylation and increased FOXO phosphorylation (Fig. 8 G and H), resulting in incremented levels of POMC mRNA and reduction in NPY mRNA levels (Fig. 8 A and B). These data justify the fact of group DIO+PB has gained less weight (Fig. 1 A) and had lower energy consumption compared with obese mice (data not shown).

We also evaluated the effect of probiotics on the main proteins of the TLR4 signaling, as well as mRNA levels of inflammatory cytokines in the hypothalamus. Similar to the classical target tissues of insulin action, administration of probiotics along with HFD reduced TLR4 hypothalamic expression, consequently decreasing JNK and IKKβ activation, levels of iNOS and IRS-1 Ser307 phosphorylation (Fig. 8 I). The mRNA levels of IL-6, IL-1β and TNF-α and TLR-4 also decreased significantly (Fig. 8 J-M).

DISCUSSION

Over the past ten years, animal and human studies have revealed a remarkable microbial influence on host metabolism, energy utilization and storage, and metabolic diseases (25,26). Here we show that the HFD changed substantially the gut microbiota composition, as well as intestinal permeability and immune function. Such changes were associated with an increase in circulating LPS levels, a reduction in GLP-1 serum levels and a decrease in whole body insulin tolerance. When these animals were treated with probiotics, they showed changes in gut microbiota and intestinal gene expression of metabolic and immunological molecules that resulted in reductions of circulating LPS, which attenuated TLR4 activation. This attenuation, in turn, provided improved insulin signaling and inflammatory profiles in hepatic, muscular and adipose tissues. In addition, the probiotics treatment reduced food intake and weight gain via hypothalamic improvements in insulin and leptin signaling pathways and modulation of important neurotransmitters that control food intake and energy expenditure.

Our metagenomic analysis of gut microbiota in the control groups, showed some differences on phyla distributions (increased Firmicutes and Actinobacteria and decreased Bacteroidetes), but they were not relevant for metabolic and immunologic changes in healthy animals. On the other hand, comparing DIO and controls animals, we observed an increase in Bacteroidetes prevalence (69% DIO vs. 52,4% C) and a slight reduction in Firmicutes (28% DIO vs. 34% C). This result was similar to results in previous studies (27-29), including a work from our group (12), but was not in agreement with other classical published data (30,31); this is evidence that the gut microbiota profile in obesity is still controversial, and it is possible that differences in animal species and in

the methods used may explain these controversial results. Another phylum that is important to intestinal homeostasis and was reduced in DIO animals compared to controls was the Actinobacteria (1,2% DIO vs. 3,7% C). Mice subjected to probiotics treatment and fed HFD showed some differences in gut microbiota profiles compared with obese non-treated animals. Despite the maintenance of Bacteroidetes phylum (67,6% DIO+PB vs. 68,1% DIO), there was a significant reduction in Firmicutes prevalence (20,5% DIO+PB vs. 28% DIO) and an increase in Actinobacteria concentration, similar to control levels (3,5% DIO+PB vs. 1,2% DIO). The lack of prevalence changes in Bacteroidetes induced us to perform a genera analysis of this phylum, which has shown significant differences. The genus *Bacteroides*, for example, increased considerably with the probiotics treatment (42%DIO+PB vs. 10%DIO) and it has beneficial activities to the host, including increased adipose tissue lipolysis, intestinal production of GLP-1, as well as reduction of intestinal inflammation (32,33). Another genus that increased with probiotics administration in obese animals was *Alistipes*. Serino et al. (34) described that mice that have high prevalence of this genus is protected from type 2 diabetes in a HFD scenario. Thus, it is observed that despite the unchanged prevalence of Bacteroidetes phylum with probiotics treatment, the genera of this phylum were changed in a positive way.

These beneficial modulations in gut microbiota of obese mice promoted by probiotics were probably the main mechanism that increased the expression of ileal tight-junctions proteins (ZO-1 and Occludin) and pro-glucagon mRNA, as well as reduced intestinal expression of pattern recognition receptors (PRRs), named CD-14 and NOD1. The consequences of such modulations were the reduction in circulating levels of LPS

and the increase in GLP-1 serum levels. In agreement with our results, Amar et al. (17) has recently published that bacterial translocation need CD-14 and NOD1 PRRs in DIO mice and probiotics treatment reversed this situation. It is also known that fermented products of probiotics bacteria can increase gut pro-glucagon expression, which results in GLP-1 and GLP-2 secretion; both are incretins and are involved in metabolic homeostasis and intestinal barrier integrity, respectively (35,36). Another important intestinal protein modulated by gut microbiota is FIAF. Obesogenic microbiota decreases the expression of this molecule, a factor able to increase lipoprotein lipase (LPL) dependent triglyceride storage in adipose tissue and to increase adipocytes triacylglycerol accumulation (11,37). FIAF is indeed an important regulator of lipid metabolism and has been shown to increase total cholesterol and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels when overexpressed in transgenic mice (38). We showed that probiotics administration increased the ileal expression of FIAF in obese mice, thereby reducing fat storage in these animals.

A great deal of data has shown the importance of LPS in inflammation and the induction of insulin resistance (4,9,13,39) The primary mechanism involving LPS is initiated when it binds TLR4, which, in turn, associates with MyD88 and triggers its signaling pathway; this, in turn, activates JNK and IKKβ, leading to serine phosphorylation of IRS-1, nuclear factor κB (NF-κB) activation, transcription of pro-inflammatory cytokines and insulin resistance (4-6). Our mice that fed HFD showed exactly the characteristics described above. Nevertheless, the obese mice treated with probiotics had a reduced portal LPS concentrations, which downregulated the TLR-MyD88 interaction in liver, muscle and adipose tissue, leading to reduced activation of

JNK and IKKβ, serine phosphorilation of IRS-1 and iNOS expression levels. An inversely related increase in activation of insulin signaling was seen in all three tissues, that was responsible for better insulin and glucose tolerances.

As previously described, the overlap between stimuli that activate IKKβ and JNK and conditions that promote insulin resistance also includes pro-inflammatory cytokines. IKKβ activation, through the phosphorylation and degradation of IκBα, initiates NFκB mediated transcription, which in certain cells enhance the production of TNF-α, IL-6, and IL1-β, which further activate JNK and IKKβ pathways through a feed-forward mechanism (40,41). This positive feedback loop could perpetuate a vicious cycle of low-grade inflammatory signaling, contributing to enhanced insulin resistance. It is also important to mention that these cytokines have been shown to play an important role in subclinical inflammation in obesity/type 2 diabetes insulin resistance (40,41). Our findings indicate that the probiotics treatment not only reduced the IKKβ activation, but also IκB-α phosphorylation and the TNFα, IL-6 e IL-1β mRNA levels in liver, muscle and adipose tissue, probably by reducing NFκB translocation into the nucleus.

In obesity, the analysis of macrophages isolated from adipose tissue demonstrates that they are responsible for most of cytokines tissue expression (42). Moreover, adipose tissue macrophage numbers increase in obesity, and these cells participate significantly in inflammatory pathways that are activated in obese individuals (43). In addition, many other studies have shown that a reduction in macrophage infiltration can decrease local inflammation in adipose tissue (44). In accordance with these data, our findings revealed that in the adipose tissue of DIO mice treated with probiotics, presented a reduction in macrophage infiltration (as determined by F4/80 staining), in crown-like structures

number and decreased adipocytes size. These morphological changes, coupled with reduced expression of inflammatory molecules are factors that may explain, at least in part, the increase in circulating adiponectin levels in treated animals. This adipokine, with potent anti-inflammatory effects, is expressed exclusively in the adipose tissue and is reduced in situations of insulin resistance (45).

Lipid accumulation in the liver is a hallmark of high-fat diet-induced insulin resistance. Nonalcoholic fatty liver disease often accompanies abdominal adiposity, and its pathological spectrum ranges from simple steatosis to steatohepatitis, advanced fibrosis, and cirrhosis (46). Inflammation has been demonstrated to play a pivotal role in the progression of this disease process (46). In addition, some studies have shown that intestinal dysbiosis induced by HFD increases intestinal permeability and hepatic steatosis. It occurs probably by the marked presence of LPS in the liver and other potentially hepatotoxic bacterial by-products such as ammonia, phenol and ethanol (47). Although in hepatic sections of DIO mice there was a large number of fat vesicles that were amply distributed across the parenchyma, mice treated with probiotics presented liver parenchyma very similar to that of the controls, with no evidence of hepatic steatosis, in parallel to a marked reduction in inflammatory pathways and cytokine expression in this tissue.

Our data showed that animals fed HFD and treated with probiotics presented decreased weight gain and food intake compared to obese non-treated counterparts. These findings allowed us to analyze deeply the central mechanisms that control feeding and thermogenesis. In mammals, food intake and energy expenditure are tightly regulated by specific neurons localized in the hypothalamus. The hypothalamus can gather

information on the body's nutritional status by integrating multiple signals, including potent hormonal signals such as insulin and leptin (48). The impairment of hypothalamic insulin and leptin signaling pathways is sufficient to promote hyperphagia, obesity, and type 2 diabetes (T2D) in different genetic rodent models with neuronal ablation of these hormones signaling (49,50). Our group and others have proposed that overnutrition and high-fat diet induce central insulin and leptin resistance through the aberrant hypothalamic activation of proinflammatory molecules, including TLR4, JNK and IKK (23,51,52). In this sense, we reported, for the first time, that probiotics administration in HFD fed mice provided a strikingly reduction in hypothalamic proteins of the TLR4 signaling pathway and also in cytokines mRNA expression. Such changes promoted the improvement of leptin and insulin signaling and reduced AMPK phosphorylation, resulting in reduced hyperphagic response by decreasing NPY mRNA and increasing POMC mRNA predominantly in the arcuate nucleus of obese animals. This regulation probably induced a decrease in food intake and weight gain. We believe that this neurotransmitter regulation of food intake had also the contribution of GLP-1, which was increased in DIO animals treated with probiotics. GLP-1 is derived from the transcription product of the pro-glucagon gene and possesses several beneficial physiological properties. It is a potent antihyperglycemic hormone, stimulates β-cell proliferation and differentiation and also acts in the hypothalamus (via humoral regulation or vagus nerve activation) contributing to a satiating effect (36). In our work, probiotics increased intestinal expression of pro-glucagon, which reinforces its modulation in enterocytes to increase circulating levels of this incretin. In future studies, it's possible to investigate whether the probiotics also acts in a direct way, via vagus

nerve, to communicate with the hypothalamus and induces anorexigenic signals.

In summary, our data demonstrate that the intestinal microbiota is a key modulator of inflammatory and metabolic pathways. The HFD promotes huge alterations in gut microflora that reflects in increased intestinal permeability, LPS translocation and systemic low-grade inflammation, resulting in decreased glucose tolerance and a hyperphagic behavior. All these obese related features were reversed by changes in the gut microbiota profile induced by probiotics in mice subjected to a HFD. In this context, we believe that probiotics can be an important tool to prevent and treat patients with obesity and insulin resistance, but we know that more studies are needed, especially to develop more specific probiotic strains for treating metabolic disorders, such as obesity.

REFFERENCES

1. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature 2006;444(7121): 840–846

2. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature 2006;444(7121):860–867

3. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest 2005;115(5):1111–1119

4. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. J Clin Invest 2006;116:3015-3025

5. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-α- and obesity-induced insulin resistance. Science 1996;271:665–668

6. Paz K, Hemi R, LeRoith D, et al. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/ threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 1997;272:29911–29918

7. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. J Biol Chem 2002;277:1531–1537

8. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. J Biol Chem. 1999;274:10689-10692

9. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes 2007;56:1761-1772

10. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet–Induced Obesity and Diabetes in Mice. Diabetes 2008;57:1470–1481.

11. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(44):15718-15723

12. Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DML, et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. Diabetologia 2012;55(10):2823-2834.

13. Cani P, Neyrinck A, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. Diabetologia 2007;50:2374–2383

14. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in high fructose fed rats. Nutrition 2007;23:62–68

15. Martin FP, Wang Y, Sprenger N et al. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial–host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. Mol Syst Biol 2008;4:157

16. Food and Agriculture Organization (FAO) and World Health Organization (WHO), Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.

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

18. Laitinen K, Poussa T, Isolauri E. The Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology and Intestinal Microbiota Group. Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomised controlled trial. Br J Nutr 2008;19:1–9.

19. Handschin C, Chin S, Li P, et al. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. J Biol Chem 2007;282:30014-30021

20. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods. 2007;69(2):330-339

21. Schenka AA, Machado CM, Grippo MC et al. Immunophenotypic and ultrastructural validation of a new human glioblastoma cell line. Cell Mol Neurobiol 2005;25:929–941

22. Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. J Hepatol 2008;48:628–637

23. Carvalheira JBC, Ribeiro EB, Araújo EP, et al. Selective impairment of insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats. Diabetologia 2003;46:1629-1640

24. Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. J Biol Chem 2006;281(28):18933-18941.

25. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. Curr Pharm Des 2009;15:1546–1558.

26. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from nondiabetic adults. PLoS One 2010;5: e9085

27. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. Am J Clin Nutr 2008;88: 894-899

28. Schwiertz A, Taras D, Schafer K, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. Obesity 2010;18:190-195

29. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, et al. Inflammasome mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. Nature 2012;482:179-185

30. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:11070-11075

31. Turnbaugh, PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 2006;444:1027-31

32. Martinez I, Wallace G, Zhang C, et al. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. Appl Environ Microbiol 2009;75:4175-4184

33. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nature Rev Immunol 2009;9:313-323

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

35. Le PE, Loison C, Struyf S, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. J Biol Chem 2003;278:25481-25489

36. Holst JJ. Glucagon and glucagon-like peptides 1 and 2. Results Probl Cell Differ 2010;50:121-135

37. Aronsson L, Huang Y, Parini P, et al. Decreased fat storage by Lactobacillus paracasei is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). PLoS One 2010;5:e13087

38. Mandard S, Zandbergen F, van SE, et al. The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. J Biol Chem 2006;281:934–944

39. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes 2007;56:1986–1998

40. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest 2006;116:1793–1801

41. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk. Science 2001;293:1673–1677.

42. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 2003;112:1796–1808

43. Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z, Ye J. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. J Biol Chem 2003;278:24944–24950

44. Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. Nature 2007;447:959–965

45. Calton EK, Miller VS, Soares MJ. Factors determining the risk of the metabolic syndrome: is there a central role for adiponectin? Eur J Clin Nutr 2013;doi: 10.1038/ejcn.2013.1. [Epub ahead of print].

46. Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine- adipokine interplay and regulation of insulin resistance. Gastroenterology 2006;131:934–945

47. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature 2012;489:242-249

48. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, et al. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. Nature 2001;413:794–795

49. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science 2000;289:2122–2125

50. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. J Clin Invest 2000;105: 1827–1832

51. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. Endocrinology 2005;146: 4192–4199

52. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. J Neurosci 2009;29: 359–370

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

R.A.B: researched data, contributed to discussion, wrote/reviewed/edited manuscript; N.T.: researched data; B.M.C.: researched data; G.Z.R.: researched data; G.P.: researched data; A.G.O.: researched data; D.G.: researched data; J.B.C.C.: reviewed/edited manuscript; S.T.O.S.: contributed to discussion, wrote/ reviewed/edited manuscript; M.J.A.S.: contributed to discussion, wrote/ reviewed/edited manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflicts of interest relevant to this work were reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank L. Janieri (Department of Internal Medicine, UNICAMP, Campinas, São Paulo) and J. Pinheiro (Department of Internal Medicine, UNICAMP, Campinas, São Paulo) for their technical assistance.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Physiologic and metabolic parameters in control mice, control mice submitted to the administration of probiotics, obese mice and obese mice submitted to the administration of probiotics. *A*: Weight gain. *B*: Epididymal fat pad weight. *C*: Fasting blood glucose *D*: Fasting serum insulin. *E*: Glucose response curve during the glucose tolerance test (GTT). *F*: Area under curve of glucose response during the GTT. *G*: Serum adiponectin. *H*: Insulin response curve during the GTT. *I*: Area under curve of inuslin response during the GTT. *J:* Hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp. Data are presented as means ± SEM of ten mice per group. #$P < 0.05$ vs. control, *$P < 0.05$ vs. DIO.

Figure 2. Effects of probiotics administration on insulin signaling in chow fed and high-fat fed mice. Representative blots show in the liver the tyrosine phosphorylation of IRb (*A*), IRS-1 (*B*), and serine phosphorylation of Akt (*C*) of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice (*upper panel*s). Total protein expression (*A–C*, *lower panel*s). In the muscle, the tyrosine phosphorylation of IRb (*D*), IRS-1 (*E*), and serine phosphorylation of Akt (*F*) of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice (*upper panel*s). Total protein expression (*D–F*, *lower panel*s). In the adipose tissue, the tyrosine phosphorylation of IRb (*G*), IRS-1 (*H*), and serine phosphorylation of Akt (*I*) of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice (*upper panel*s). Total protein expression (*G–I*, *lower panel*s). Data are presented as means ± SEM from six mice per group, #$P < 0.05$ vs. control, *$P < 0.05$ vs. DIO. IB, immunoblotting; p, phosphorylated.

Figure 3. The effect of probiotics on TLR4 activation and its downstream effectors. A, C, E: Expression and activity of proteins involved in the TLR4 signaling in liver (A), muscle (C) and adipose tissue (E) of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. B, D, F (*upper panels*): TLR4/MyD88 interaction in liver (B), muscle (D), and adipose tissue (F) of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. Total protein expression of MyD88 (B, D, F *lower panel*s). Data are presented as means ± SEM from six mice per group, #$P < 0.05$ vs. control, *$P < 0.05$ vs. DIO. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitate; p, phosphorylated.

Figure 4. Effects of probiotics on TNF-α, IL-1β and IL-6 mRNA tissue expression in control mice, control mice submitted to the administration of probiotics, obese mice and obese mice submitted to the administration of probiotics. Determination of TNF-α mRNA expression by real-time PCR in the liver (*A*), gastrocnemius muscle (*B*) and epididymal adipose tissue (*C*). Determination of IL-6 mRNA expression by real-time PCR in the liver (*D*), gastrocnemius muscle (*E*) and epididymal adipose tissue (*F*). Determination of IL-1β mRNA expression by real-time PCR in the liver (*G*), gastrocnemius muscle (*H*) and epididymal adipose tissue (*I*). Data are presented as means ± SEM of eight mice per group, #$P < 0.05$ vs. control group and *$P < 0.05$ vs. DIO.

Figure 5. Effects of probiotics administration on bacterial phylum prevalence in mice faeces. *A-D:* Metagenomic analysis of gut microbiota prevalence in control mice (*A*), control mice submitted to the administration of probiotics (*B*), obese mice (*C*) and

obese mice submitted to the administration of probiotics (*D*). *E-F:* prevalence of some genera inside the Bacteroidetes and Firmicutes families in DIO and DIO+PB mice. Phylum charts were extracted using METAREP software based on BLASTX analysis of DNA pyrosequencing from mouse faeces.

Figure 6. Effects of probiotics administration on ileal tight-junctions proteins, on gut metabolic and immunologic modulations and on LPS portal levels. A: ileal levels of Fiaf mRNA of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. C and F: molecules of the system of recognition pattern, CD14 mRNA (C) and NOD1 protein (F), in ileum of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. D and E: ileal tight-junctions proteins, ZO-1 (D) and Occludin (E), of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. B and G: serum concentrations of GLP-1 (G) and its intestinal precursor, Pro-glucagon (B). H: portal levels of LPS of control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. I: Bacterial counts were taken from control, C+PB, DIO and DIO+PB mouse faeces Data are presented as means ± SEM from six mice per group, $*P < 0.05$ vs. control group and $\#P < 0.05$ vs. DIO. IB, immunoblotting.

Figure 7. Morphologic characterization of liver and adipose tissue samples. *A-D*: Hematoxylin & eosin staining of 5 µm histological sections of liver parenchyma from control (*A*), C+PB (*B*), DIO mice (*C*) and DIO+PB mice (*D*). E-H: F4/80 immunostaining of 5 µm histological sections of epididymal fat pad from control (*E*), C+PB (*F*), DIO mice (*G*) and DIO+PB mice (*H*). *Red arrows* indicate Crown-like structures. Scale bar 100µm of all pictures. Original magnification X 200. Quantification

of adipocytes area (square micrometers) (*I*). Prevalence of Crown-like structures (J). Each bar represents the mean±SEM from three different experiments, #*P* < 0.05 vs. control group and **P* < 0.05 vs. DIO.

Figure 8. Effects of probiotics administration on leptin and insulin hypothalamic signalings, on the control of food intake and on proteins involved in the inflammatory signaling. *A-B:* POMC (A) and NPY (B) mRNA levels in control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. *C:* six days of controlled food intake; the two first days with daily intraperitoneal infusion of saline and the four last days with daily intraperitoneal infusion of recombinant leptin in DIO and DIO+PB mice. *D:* 4h and 12h of food intake after intrahypothalamic infusion of insulin in DIO and DIO+PB mice. *E:* Leptin-induced Jak2 and STAT3 tyrosine phosphorylation in the hypothalamus of DIO and DIO+PB mice. *F:* Insulin-induced IRβ, IRS-1 tyrosine phosphorylation and Akt serine phosphorylation in the hypothalamus of DIO and DIO+PB mice. *G-H:* hypothalamic phosphorylation of FOXO (*G*) and AMPK (*H*) in control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. *I:* JNK, IIK phosphorylation, IRS-1 serine307 phosphorylation and total protein expression of iNOS, TNF-α in control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. *J-M:* determination of mRNA expression of TLR-4 *(J)*, IL-6 *(K)*, IL-1β *(L)* and TNF-α *(M)* in control, C+PB, DIO and DIO+PB mice. Immunoblotting data are representative of three independent experiments. qPCR RT and food intake data are presented as means ± SEM from six mice per group. #*P* < 0.05 vs. control group and **P* < 0.05 vs. DIO, except for panels *C-F:* * p<0,05 vs. DIO positive, # p<0,05 vs. DIO+PB negative, § p<0,05 vs. DIO negative. IB, immunoblotting; p, phosphorylated.

Figure 1

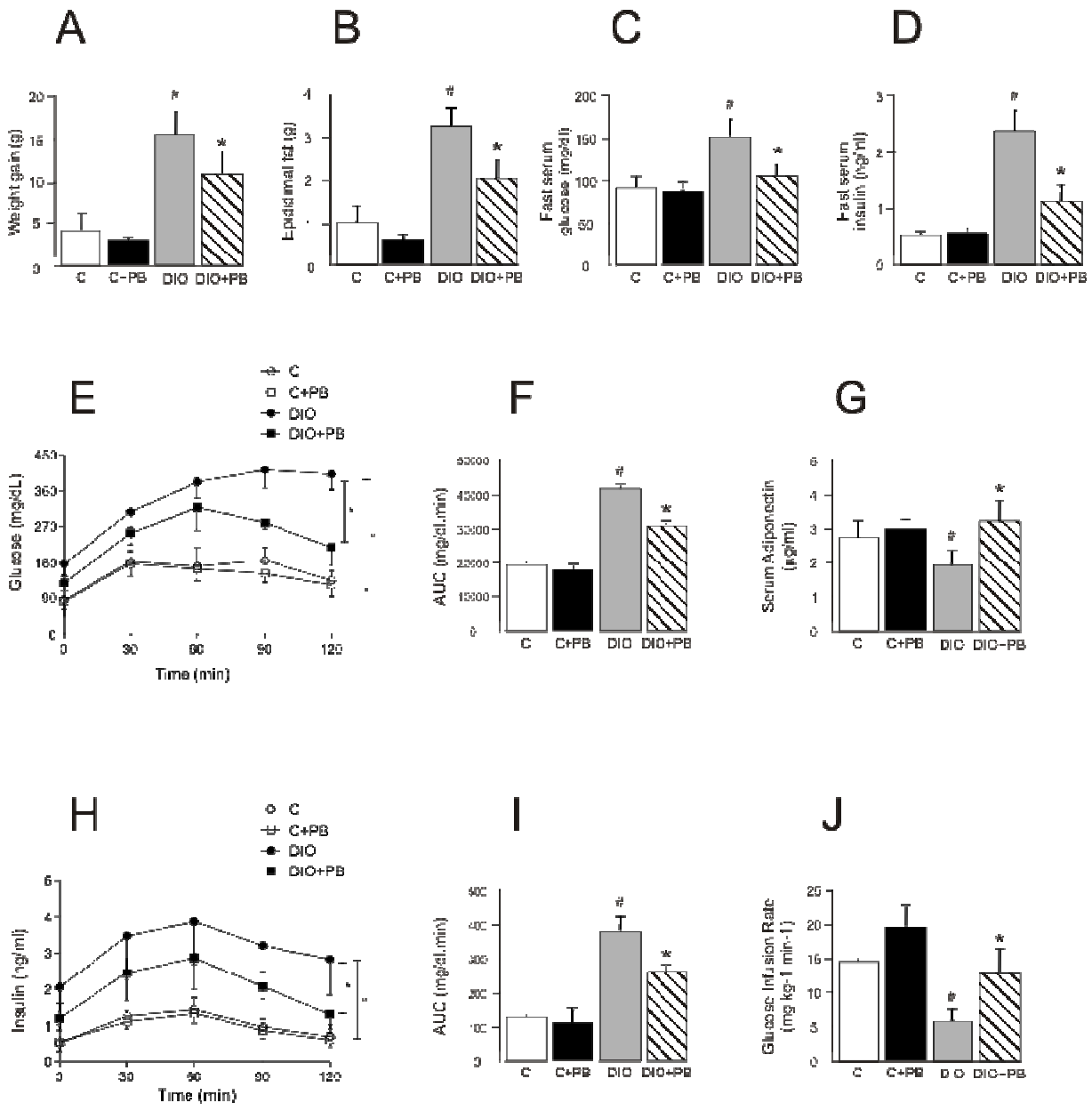

A
B
C
D
Weight gain (g)
Epididimal fat (g)
Fast serum glucose (mg/dl)
Fast serum insulin (ng/ml)
C
C+PB
DIO
DIO+PB
E
F
G
Glucose (mg/dL)
Time (min)
AUC (mg/dl.min)
Serum Adiponectin (µg/ml)
H
I
J
Insulin (ng/ml)
Glucose Infusion Rate (mg kg-1 min-1)

Figure 2

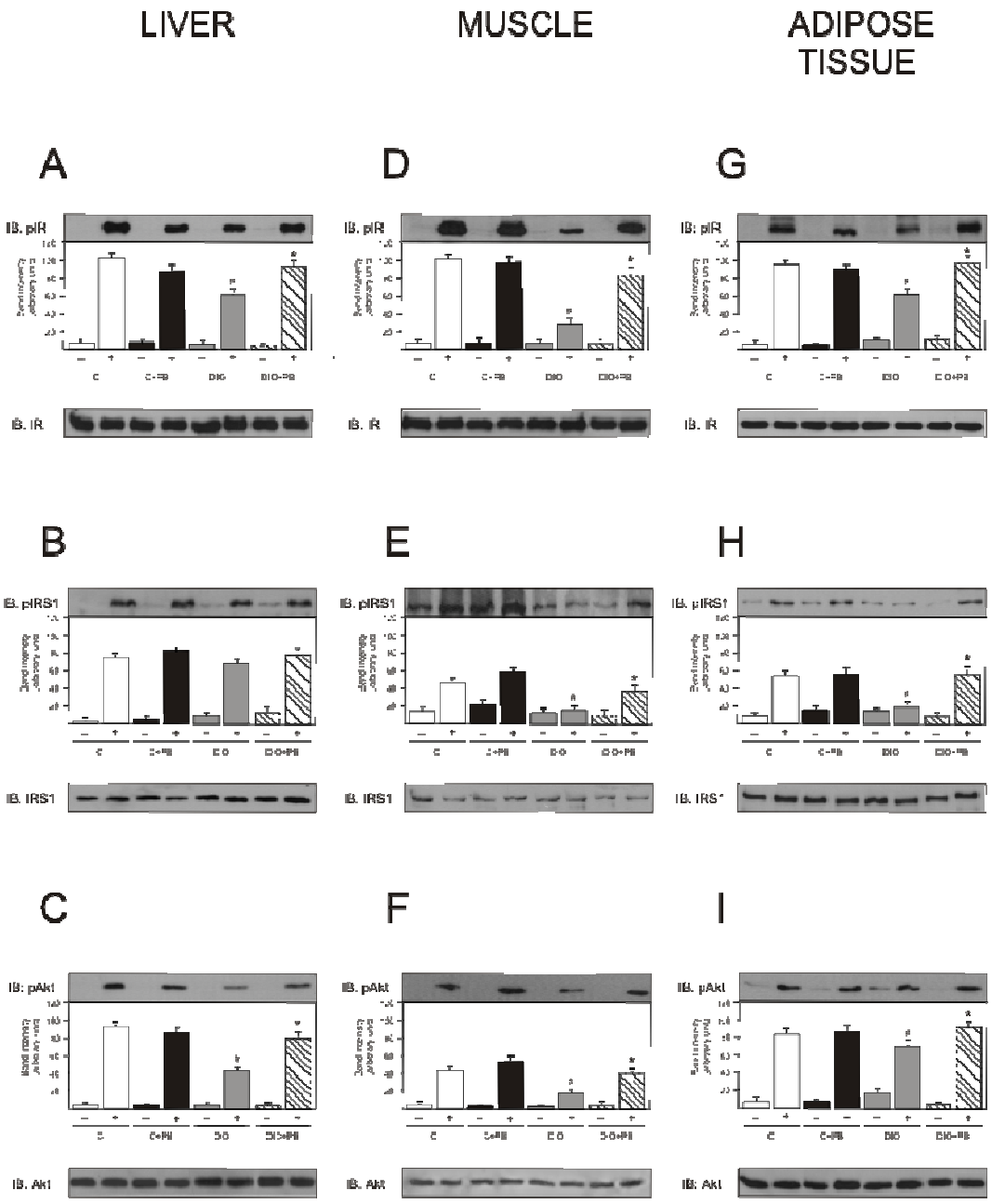

LIVER
MUSCLE
ADIPOSE TISSUE
A
D
G
IB: pIR
IB: IR
B
E
H
IB: pIRS1
IB: IRS1
C
F
I
IB: pAkt
IB: Akt

Figure 3

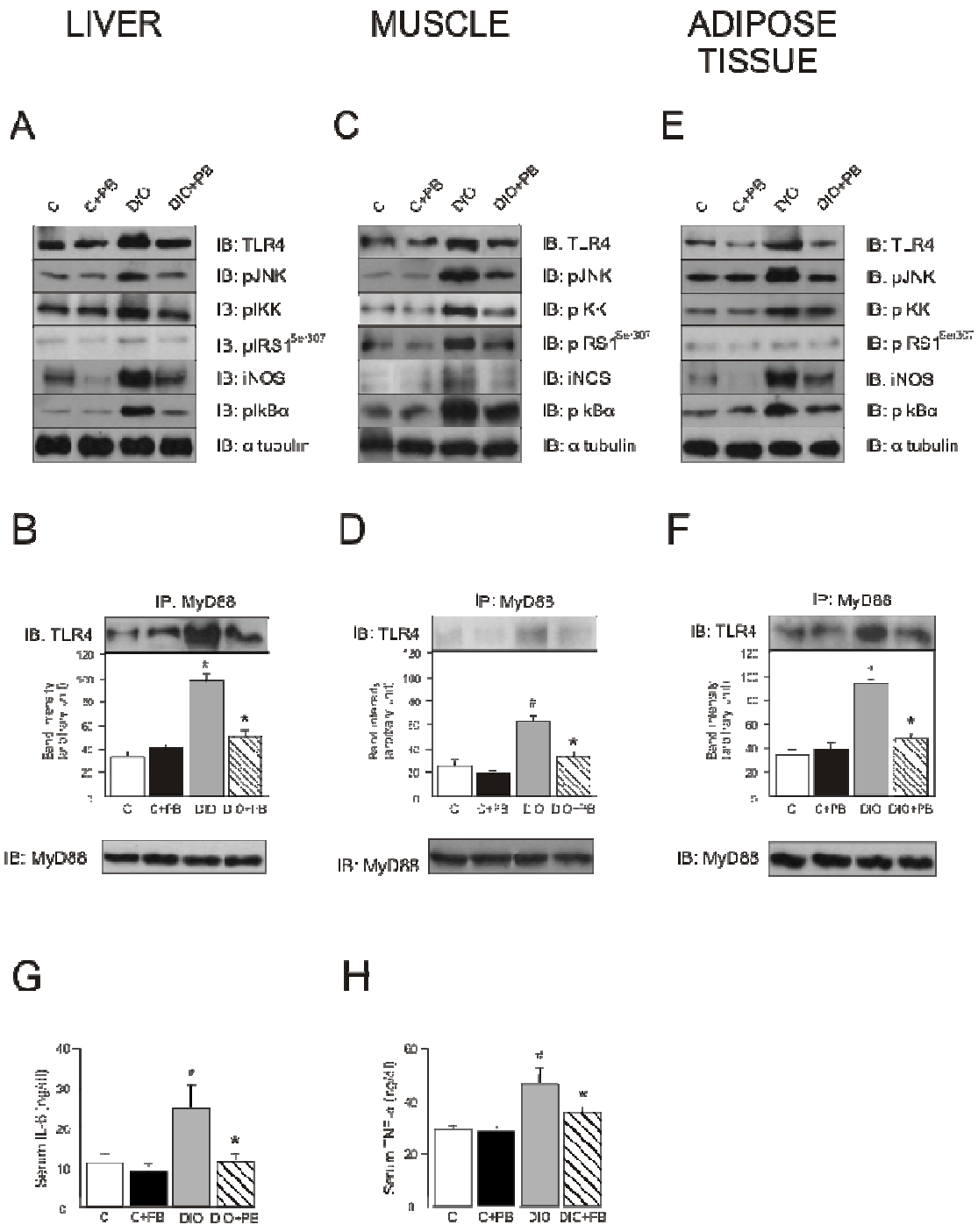

LIVER
MUSCLE
ADIPOSE TISSUE
A
C
E
C
C+PB
DIO
DIO+PB
IB: TLR4
IB: pJNK
IB: pIKK
IB: pIRS1Ser307
IB: iNOS
IB: pIκBα
IB: α tubulin
B
D
F
IP: MyD88
IB: TLR4
IB: MyD88
G
H
Serum IL-6 (ng/ml)
Serum TNF-α (ng/ml)

Figure 4

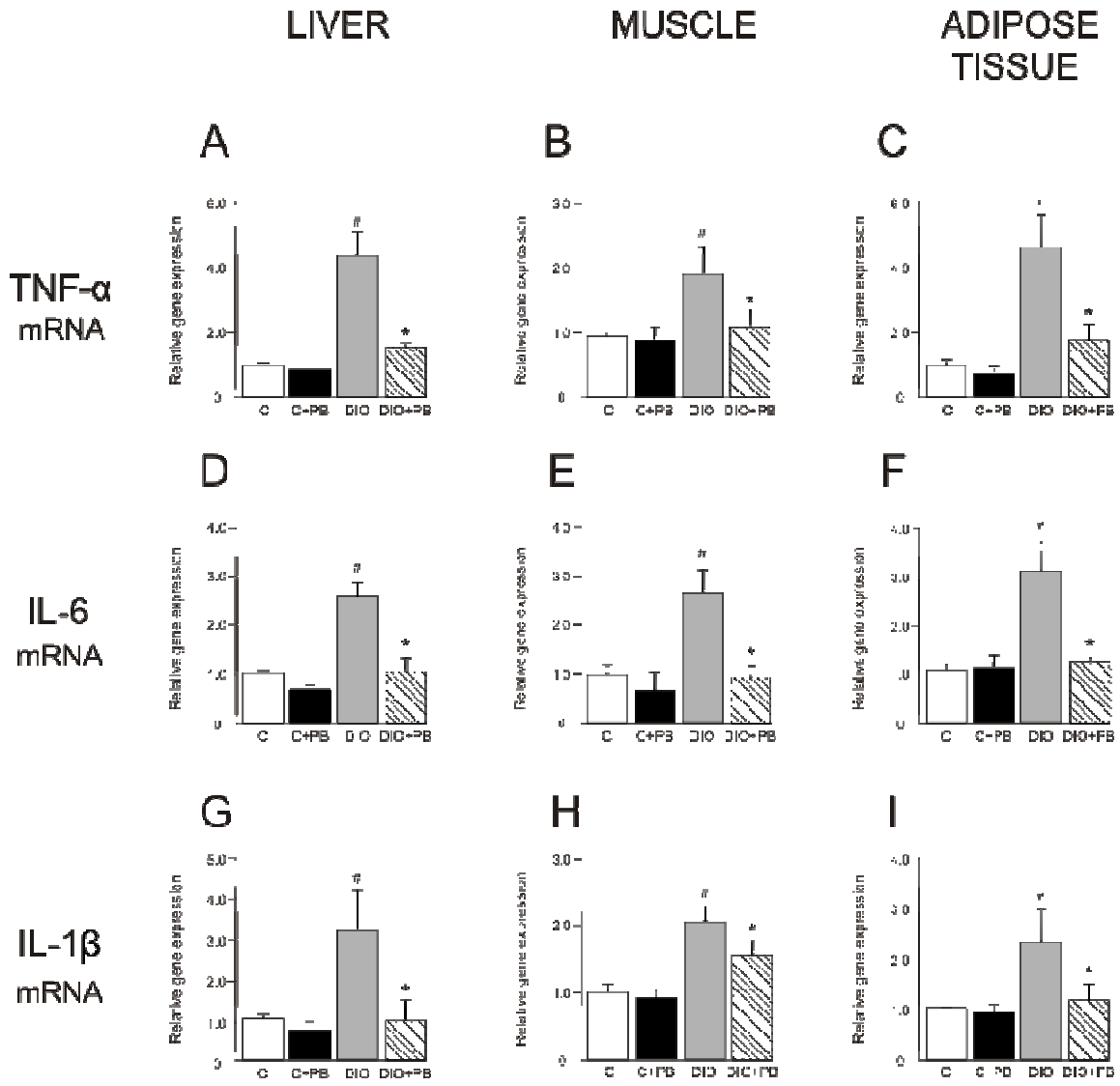

LIVER
MUSCLE
ADIPOSE TISSUE
A
B
C
D
E
F
G
H
I
TNF-α mRNA
IL-6 mRNA
IL-1β mRNA
C
C+PB
DIO
DIO+PB

Figure 5

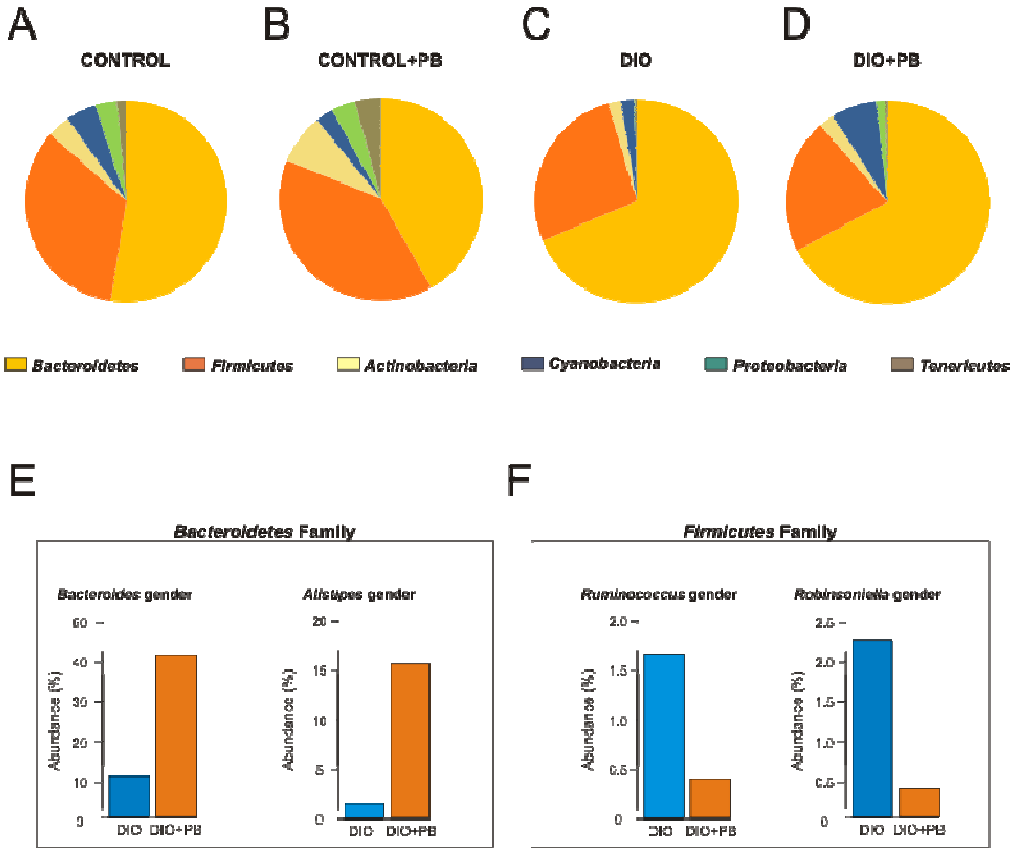

A
CONTROL
B
CONTROL+PB
C
DIO
D
DIO+PB
Bacteroidetes
Firmicutes
Actinobacteria
Cyanobacteria
Proteobacteria
Tenericutes
E
Bacteroidetes Family
Bacteroides gender
Alistipes gender
Abundance (%)
DIO
DIO+PB
F
Firmicutes Family
Ruminococcus gender
Robinsoniella gender

Figure 6

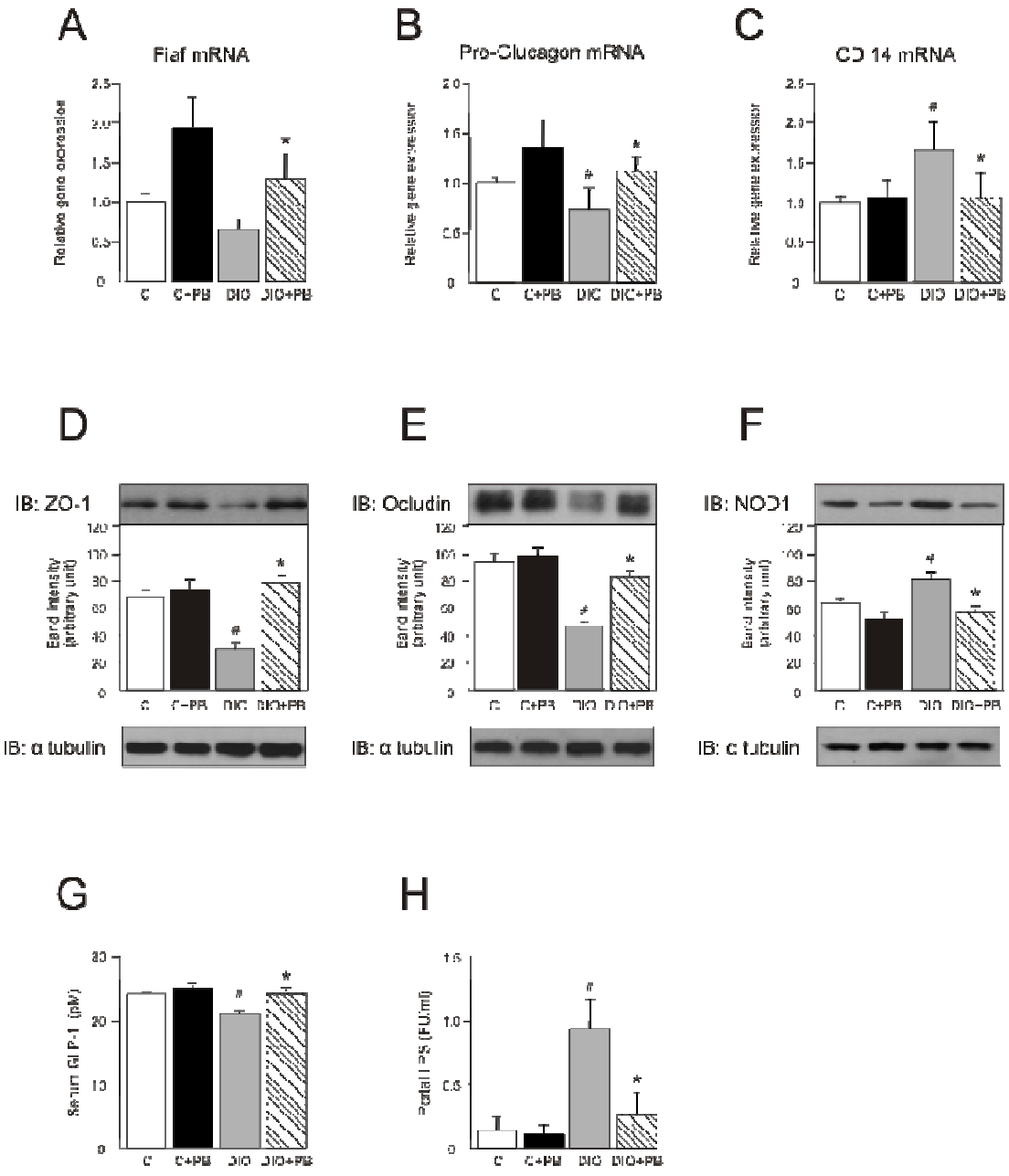
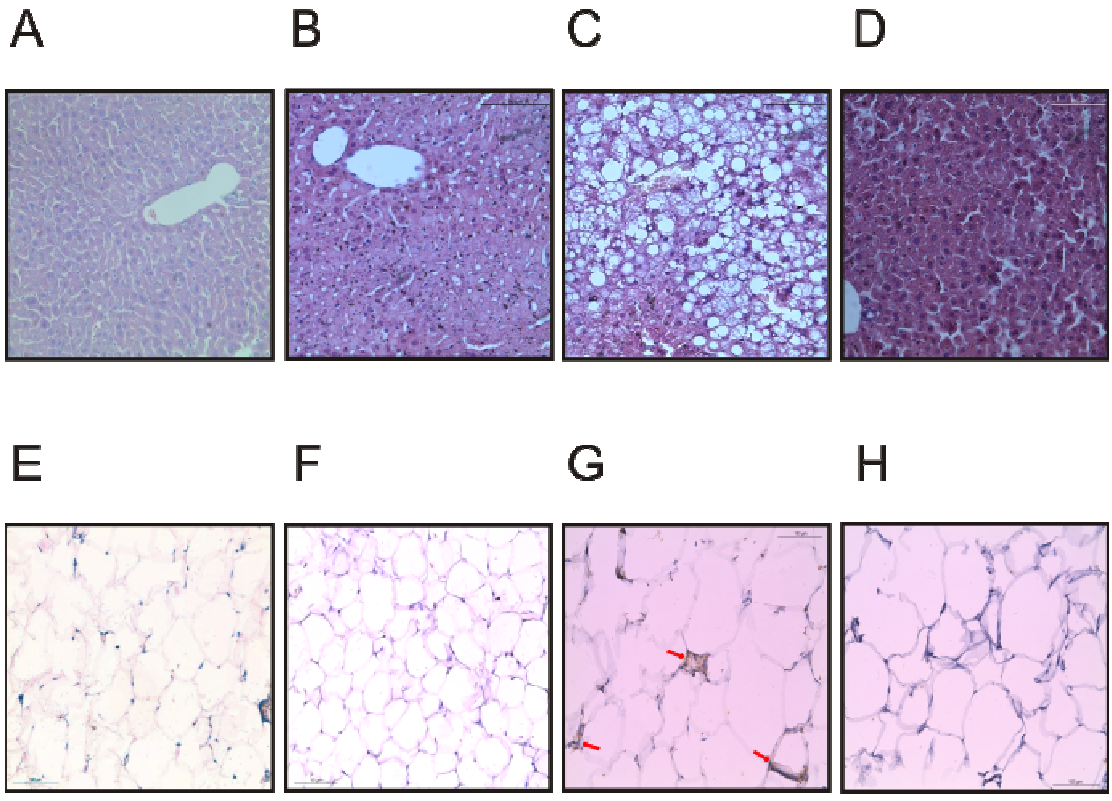
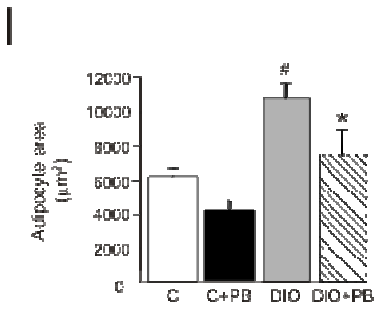

A
Fiaf mRNA
Relative gene expression
C
C+PB
DIO
DIO+PB
B
Pro-Glucagon mRNA
C
C+PB
DIO
DIO+PB
C
CD 14 mRNA
C
C+PB
DIO
DIO+PB
D
IB: ZO-1
Band intensity (arbitrary unit)
IB: α tubulin
E
IB: Ocludin
IB: α tubulin
F
IB: NOD1
IB: α tubulin
G
H

Figure 7


A
B
C
D
E
F
G
H


I
Adipocyte area (µm²)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
#
*
C
C+PB
DIO
DIO+PB

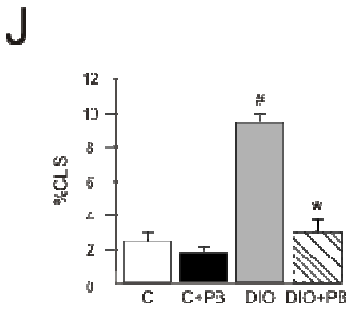
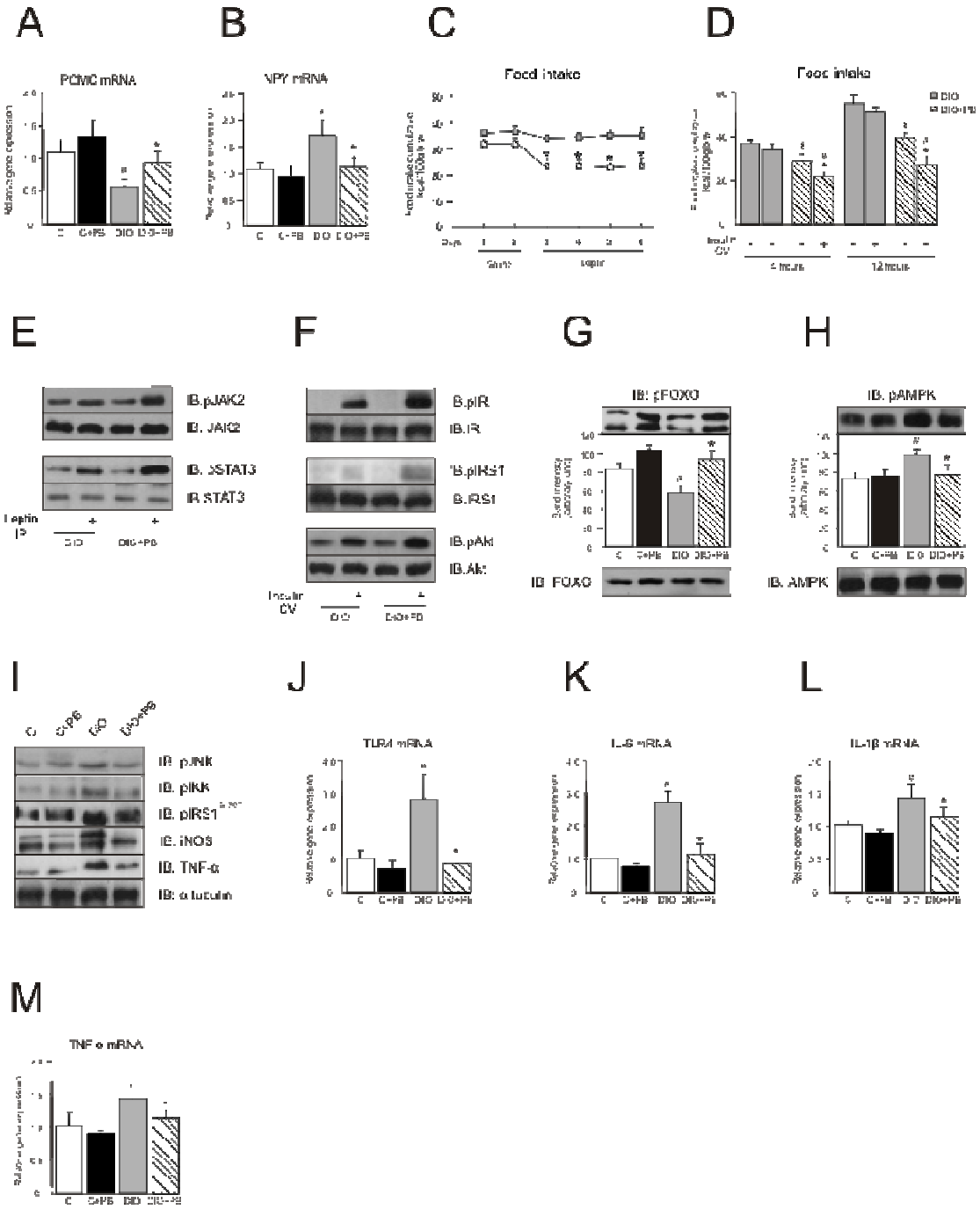

J
%CLS
12
#
*
C
C+PB
DIO
DIO+PB

Figure 8


A
POMC mRNA
B
NPY mRNA
C
Food intake
D
Food intake
E
IB.pJAK2
IB. JAK2
IB. pSTAT3
IB STAT3
Leptin
IP
F
IB.pIR
IB.IR
IB.pIRS1
IB.IRS1
IB.pAkt
IB.Akt
Insulin
IV
G
IB: pFOXO
IB. FOXO
H
IB. pAMPK
IB. AMPK
I
IB: pJNK
IB. pIKK
IB. pIRS1
IB. iNOS
IB. TNF-α
IB: α tubulin
J
TLR4 mRNA
K
IL-6 mRNA
L
IL-1β mRNA
M
TNF-α mRNA

Supplementary Table 1. Mouse Primer sequences for qPCR-RT

Nome do Gene	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
Anglp-4 (Fiaf)	GGGACCTTAACTGTGCCAAGAG	GGAAGTATTGTCCATTGAGATTGGA
CD14	CTTCCCACAGGCAGCACAG	AATGATGAGAGGCAGCAAGAGG
GAPDH	CTCATGACCACAGTCCATGC	CACATTGGGGGTAGGAACAC
IL-1β	AAATGCCTCGTGCTGTCTGACC	CTGCTTGAGAGGTGCTGA TGTACC
IL-6	GGAAATCGTGGAAATGAGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTCATAC
NPY	AATCAGTGTCTCAGGGCTGGAT	CCGCTCTGCGACACTACATC
POMC	AAGAGCAGTGACTAAGAGAGGCCA	ACATCTATGGAGGTCTGAAGCAGG
Pro-glucagon	TGGCAGCACGCCCTTC	GCGCTTCTGTCTGGGA
TLR4	GCAGAAAATGCCAGGATGATG	AACTACCTCTATGCAGGGATTCAAG
TNF-α	AGTTCCCAAATGGCCTCCC	TGTCACTCGAATTTTGAGAAGATG