

A obesidade induzida por dieta prejudica a indução
de tolerância oral em camundongos

Belo Horizonte
2018

LÍCIA TORRES

Orientadora: Tatiani Uceli Maioli

Co-orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Área de concentração: Bioquímica e imunologia nutricional

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para a obtenção do título de mestre.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia de Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Belo Horizonte

2018

Torres, Licia.
T693o A obesidade induzida por dieta prejudica a indução de tolerância oral em camundongos [manuscrito]. / Licia Torres. - - Belo Horizonte: 2018. 87f.
Orientador (a): Tatiani Uceli Maioli.
Coorientador (a): Ana Maria Caetano de Faria.
Área de concentração: Nutrição e saúde.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Obesidade. 2. Sistema Imunitário. 3. Dieta. 4. Camundongos. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Maioli, Tatiani Uceli. II. Faria, Ana Maria Caetano de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: WD 210

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

ATA DE NÚMERO 30 (TRINTA) DA SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA LÍCIA TÔRRES PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.

Aos 16 (dezesesseis) dias do mês de agosto de dois mil e dezoito, às 14:00 horas, realizou-se no Anfiteatro da Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da UFMG, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação " *A OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA PREJUDICA A INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL EM CAMUNDONGOS* ", da aluna *Lícia Tôrres*, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Bioquímica e Imunologia Nutricional". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: Tatiani Uceli Maioli, Ana Maria Caetano de Faria, Adaliene Versiani Matos Ferreira e Momtchilo Russo, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

APROVADO;

APROVADO COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;

REPROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Mateus Gomes Pedrosa, Secretário do Colegiado de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de agosto de 2018.

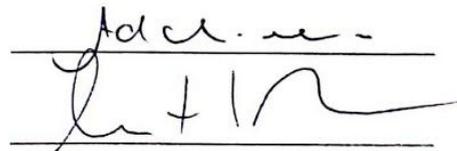
Prof.^a. Dr.^a. Tatiani Uceli Maioli
Presidente (UFMG)



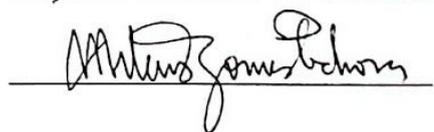
Prof.^a. Dr.^a. Ana Maria Caetano de Faria
(UFMG)



Prof.^a. Dr.^a. Adaliene Versiani Matos Ferreira
(UFMG)



Prof. Dr. Momtchilo Russo
(USP)



Mateus Gomes Pedrosa
Secretário do Colegiado de Pós-Graduação

HOMOLOGADO em
reunião do CPGNS
Em 13/09/2018

RESUMO

A obesidade está associada a várias alterações no sistema imune da mucosa intestinal que pode interferir na indução tolerância oral aos antígenos da dieta. Assim, nosso objetivo foi avaliar se as alterações provocadas pela obesidade induzida por dieta hipercalórica (HSB) interferem na indução da tolerância oral (TO). Para isso, usamos camundongos C57BL/6 e C57/BL6 GFP *Knock-in* para Foxp3 entre 6 a 7 semanas de idade. Os animais foram tratados por 13 semanas com dieta hipercalórica e posteriormente foram submetidos ao protocolo de indução de TO utilizando como antígeno ovalbumina (OVA) (10mg) administrada por uma única dose ou de forma contínua. Sete dias após o tratamento oral os animais foram imunizados com 10µg de OVA em 1mg de Al(OH)₃. Um reforço com 10µg OVA em salina foi administrado via intraperitoneal 14 dias após a sensibilização, e 7 dias seguidos do reforço os animais foram eutanasiados. Os camundongos alimentados com a dieta HSB apresentaram maior ganho de peso corporal e índice de adiposidade, além de alterações de parâmetros bioquímicos associados à obesidade (colesterol, triglicérides e glicemia). Em adição, os animais obesos apresentaram redução das subpopulações de células dendríticas (DCs) CD103⁻CD11b⁺ e CD103⁺CD11b⁺ nos linfonodos mesentéricos (LNMs) e aumento da permeabilidade intestinal. Quando tratados oralmente com OVA, os camundongos com obesidade induzida por dieta apresentaram-se resistentes à indução de tolerância oral, com presença de altos níveis séricos de Ig total e IgG1-antiOVA, quando comparados aos camundongos que consumiram a dieta controle. Ao considerar a resposta imune celular, os camundongos alimentados com a dieta HSB tiveram aumento da produção IFN-γ por células dos LNMs e baço após a indução de TO. Porém, quando tratados com OVA de forma contínua estes ficaram tolerantes ao antígeno administrado por via oral, OVA, demonstrado pela diminuição de IgG1 anti-OVA. A frequência de células Treg LAP⁺ e Foxp3⁺ foram aumentadas e camundongos alimentados com AIN93G no tecido adiposo e nos LNMs após a indução da TO. Já nos camundongos alimentados com HSB não foi identificado diferenças entre os animais imunizados e os que receberam OVA por gavagem. O aumento de células reguladoras ocorreu apenas em animais com obesidade induzida por dieta quando o antígeno foi administrado de forma contínua. Portanto, a identificação dos mecanismos de como a obesidade interfere na indução de tolerância oral poderá esclarecer o porquê da maior ocorrência e maior gravidade de doenças alérgicas e autoimunes em indivíduos obesos.

Palavras chave: Tolerância oral, obesidade, sistema imune.

ABSTRACT

Obesity is associated with several alterations in the gut immune system that can complicate antigen-specific tolerance to luminal antigens. Our aim was to evaluate whether alterations due to obesity induced by consumption of high-carbohydrate and high-fat (HSB) diet interfere with the induction of oral tolerance (OT). A diet containing high amounts of carbohydrate and fat (HSB) were offered to 6-week-old C57BL/6 mice during 13 weeks before OT was induced by a single gavage of 10mg ovalbumin (OVA). Mice were immunized afterwards with 10 μ g of OVA in 1mg of Al(OH)₃. Seven days after treatment, mice were injected intraperitoneally (i.p) with 10 μ g OVA plus 1mg of Al(OH)₃. A booster of 10 μ g of OVA in saline was given i.p 14 days later and 7 days thereafter, mice were then euthanized. HSB-fed mice had a greater body weight gain and adiposity index and biochemical parameters indicative of obesity (cholesterol, triglycerides e glycaemia). Moreover, HSB-fed mice presented changes in dendritic cell (DC) profile in mesenteric lymph nodes (mLN) with decreased CD103⁺CD11b⁺ as well as CD11b⁺CD103⁻ subpopulations of DCs and increased intestinal permeability. When orally treated with OVA, these obese mice were resistant to oral tolerance induction as shown by their high levels of specific serum Ig total and IgG1 when compared to control orally tolerized mice. Regarding cellular immune response, mice fed with HSB had higher IFN- γ production by mLN cells and spleen, after oral tolerance induction. However, when treated continually with OVA, they became tolerized to the antigen, administered via oral, demonstrating by the decrease in IgG1 anti-OVA. After oral tolerance induction, Treg LAP⁺ and FOXP3⁺ cells were increased in adipose tissue and mLN of mice fed AIN93G diet. In obese mice, this frequency was not different after OVA administration by gavage. However, Treg cells was increased in adipose tissue and mLN of mice which received oral treatment with OVA by continuous feeding. Therefore, explaining how obesity affects oral tolerance induction could elucidate why there are higher occurrence of allergic and autoimmune diseases in obese individuals.

Keys words: *Oral tolerance, obesity, immune system*

SÚMARIO

Sumário

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
Epidemiologia da obesidade	10
O Tecido Adiposo	11
Resposta Imune na Obesidade	15
O Tecido Linfoide Associado à Mucosa Intestinal (GALT)	17
A Tolerância Oral e as repercussões da obesidade na mucosa	20
2. OBJETIVO GERAL:	27
3. HIPÓTESE	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Cálculo amostral	29
4.2. Ingestão Alimentar	29
4.3. Peso corporal	30
4.4. Índice de adiposidade	31
4.5. Teste de Tolerância a Glicose (GTT)	31
4.6. Triglicerídeos e colesterol total	31
4.7. Histologia do Intestino Delgado	32
4.8. Morfometria das vilosidades	32
4.9. Contagem de linfócitos intraepiteliais (IEL)	32
4.10. Contagem de células caliciformes	33
4.11. Análise histológica do tecido hepático	33
4.12. Análise histológica do tecido adiposo	33
4.13. Permeabilidade Intestinal	34
4.14. Medida de IgA secretória (SIgA)	34
4.15. Indução da Tolerância Oral	35
4.15.1. Tratamento Grupo Experimental	35
4.16. Obtenção do Soro	36
4.17. Ensaio Imunoenzimático para Medida de Anticorpos Anti-OVA	36
4.18. Obtenção células de órgãos linfoides	37

4.19. Cultura de Células	38
4.20. Obtenção de suspensão de células do tecido adiposo	38
4.21. Citometria de Fluxo	39
4.22. Ensaio Imunoenzimático para medida de citocinas	43
4.23. Análise Estatística	43
5. RESULTADOS	45
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÃO	73
8. PERSPECTIVAS	74
9. REFERÊNCIAS	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dietética das dietas utilizadas (AIN93G e HSB)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Obesidade induzida por dieta está associada a alterações metabólicas e imunes da mucosa intestinal.

Figura 2: Morfometria dos vilos intestinais.

Figura 3: Delineamento experimental para o estabelecimento de tolerância oral

Figura 4 - Imunofenotipagem de células dendríticas dos LNMs.

Figura 5 - Imunofenotipagem de células TCD4⁺ reguladoras e ativadas e células TCD8⁺ nos LNMs e tecido adiposo.

Figura 6: O consumo de dieta HSB induz ganho de peso e hipertrofia do tecido adiposo

Figura 07: Consumo dietético avaliado em Kcal foi maior no grupo tratado com dieta HSB

Figura 8: O consumo da dieta HSB causou hiperglicemia e dislipidemia em camundongos

Figura 9: Frequência de linfócitos intraepiteliais e células caliciformes estão aumentadas no duodeno de camundongos tratados com dieta HSB

Figura 10: A frequência de células caliciformes no cólon de camundongos tratados com dieta AIN93G ou HSB não foi diferente..

Figura 11: A obesidade induzida por dieta aumentou a permeabilidade intestinal em camundongos.

Figura 12: Aumento da concentração de anticorpos IgA secretório em animais obesos..

Figura 13: Macrófagos e subpopulações de DCs estão reduzida em camundongos com obesidade induzida por dieta nos LNMs..

Figura 14: Animais obesos não desenvolveram tolerância oral ao antígeno administrado por gavagem.

Figura 15: Produção de citocinas por células esplênicas de camundongos tratados com OVA por gavagem

Figura 16 Produção de citocinas pelos LNMs de camundongos tratados com OVA por gavagem.

Figura 17: Camundongos com obesidade induzida por dieta tornam-se tolerantes quando a OVA é administrada por ingestão contínua

Figura 18: A ingestão contínua de OVA favorece o aumento da frequência de células reguladoras nos LNMs tanto em camundongos normais, quanto nos obesos.

Figura 19: Alteração da população de células T efetoras e Tregs Foxp3+ e LAP+ no tecido adiposo após a indução de TO.

LISTA DE ABREVIACOES

°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µl	Microlitros
ml	Mililitros
mg	Miligramas
Al(OH) ₃	Hidróxido de Alumínio
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
AHR	Hiperreatividade Brônquica
AR	Acido retinóico
Con A	Concanavalina A
CTLA-4	Molécula Citotóxica Associada aos Linfócitos T-4
DC	Célula Dendrítica
DP	Desvio Padrão
ELISA	Ensaio Imuno Adsorvente Ligado à Enzima Isocianato de Fluoresceína
ER	Retículo Endoplasmático
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FFA	Ácidos Graxos Livres
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino
GTT	Teste de Tolerância Oral a Glicose
HIF1α	Fator Induzido por Hipóxia-1
HSB	High Sugar Butter
IFN	Interferon
i.p.	Intraperitoneal
IGF	Fator de crescimento Semelhante à Insulina
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
ILC	Células Linfoides Inata
aLNM	Linfonodo Mesentérico
IMC	Índice de Massa Corporal
MEC	Matrix Extra Celular
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofenileno-diamino

OVA	Ovalbumina
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PP	Placas de Peyer
PPAR- γ	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma
RPM	Rotações por minuto
s.c	Subcutâneo
TA	Tecido Adiposo
TGF	Fator de Transformação e Crescimento
TCR	Receptor de células T
Th	Linfócito auxiliar (T helper)
Th1	Resposta Celular do Tipo 1
Th2	Resposta Celular do Tipo 2
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TO	Tolerância Oral
Tregs	Células T Reguladoras Específicas
UCP-1	Proteína Desacopladora-1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Epidemiologia da obesidade

A obesidade é uma doença multifatorial complexa e está associada a ocorrência de doenças metabólicas, cardiovasculares e doenças inflamatórias crônicas, como dislipidemia, doença hepática não alcoólica, hipertensão e doença coronariana (WINER et al., 2016). Estima-se que em 2010 o excesso de peso e a obesidade foram causa de 3,4 milhões de óbitos, 3,9% dos anos de vida perdidos e 3,8% dos anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) em todo o mundo (HRUBY, ADELA; HU, 2015). Um estudo que avaliou a prevalência mundial de sobrepeso e obesidade em crianças e adultos durante 1980-2013 identificou aumento na proporção de adultos com índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 25kg/m² de 28,8% para 36,9% em homens, e de 29,8% para 38,0% em mulheres (NG et al., 2014). No Brasil a prevalência da população com excesso de peso (IMC≥25Kg/m²) e obesidade (IMC≥30Kg/m²) em 2016 foi de 53,8% e 18,9%, respectivamente. Segundo a pesquisa realizada pelo Vigitel (2016) houve aumento da prevalência de excesso de peso de 6,8% e de 6,2% de obesidade entre os anos de 2008 a 2016 (BRASIL, 2017). A frequência de obesidade aumenta duas vezes da faixa etária de 18 a 24 para 25 a 34 anos de idade e diminui com o aumento da escolaridade (BRASIL, 2017).

Outro trabalho realizado em 200 países nos anos de 1975 a 2014 que avaliou 19,2 milhões de pessoas, identificou aumento global da prevalência de obesidade que passou de 34 milhões de homens e 71 milhões de mulheres em 1975, para aproximadamente 266 milhões de homens e 375 milhões de mulheres em 2014. No ranque mundial, o Brasil que ocupava a décima posição de homens obesos em 1975, passou para a terceira posição em 2014, já mulheres obesas evoluiu da nona para a quinta colocação (DI CESARE *et al.*, 2016). Ainda segundo DI CESARE *et al.*, 2016, se as tendências atuais continuarem até 2025, a prevalência global de obesidade chegará a 24% nos homens e ultrapassará 27% nas mulheres.

Muitos fatores, incluindo alta ingestão de carboidratos, lipídeos e baixo nível de atividade física podem desempenhar papel importante no desenvolvimento da obesidade. Modificações dietéticas e de estilo de vida são um dos principais tratamentos para a obesidade, no entanto, são abordagens difíceis de serem sustentadas em longo prazo (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Miller V, *et al.*, 2017 (MILLER et

al., 2017), avaliou o consumo de frutas, legumes e verduras que são considerados marcadores de uma alimentação adequada e saudável em 18 países totalizando 135335 participantes e identificou maior consumo de frutas, legumes e verduras em indivíduos com nível mais alto de educação e etnia branca. No Brasil, a frequência de consumo de frutas e verduras foi de 35,2%, sendo menor para homens (28,8%) quando comparado a mulheres (40,7%). Já o consumo de carne com gordura foi de 32,% da população, condição duas vezes mais frequente em homens (43,1%) do que mulheres (22,5%) (BRASIL, 2017). Estes dados mostram consumo de frutas, verduras e legumes muito inferior ao recomendado pela Organização Mundial da Saúde e Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (OMS/FAO), que orienta o consumo de 400g/dia (excluindo tubérculos). Segundo as duas organizações, o consumo de uma ampla variedade de frutas e verduras assegura a adequação da maioria dos micronutrientes, fibras e outras substâncias essenciais (WHO, 2003). Além disso, o aumento do consumo destes alimentos pode substituir o consumo excessivo de alimentos que contêm muita gordura saturada, açúcar e sal, nutrientes que quando consumidos em excesso podem ser preditores de doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, dislipidemia e obesidade.

O Tecido Adiposo

O tecido adiposo é constituído principalmente pela diferenciação de células-tronco mesenquimais multipotentes (MSCs) em adipócitos maduros, isso envolve uma complexa integração de vias de sinalização e reguladores de transcrição (CRISTANCHO; LAZAR, 2011). As células precursoras de adipócitos são denominadas convencionalmente de pré-adipócitos (TCHKONIA et al., 2013). Estudos recentes mostraram que 15 a 50% das células no tecido adiposo são formadas a partir de pré-adipócitos, sendo o grupo de células progenitoras humanas mais responsivas ao excesso de nutrientes e lesões. Em resposta a estímulos como fator de crescimento-1 (IGF-1), lipídios e glicocorticoides os pré-adipócitos diferenciam-se em células adiposas (TCHKONIA et al., 2007).

Devido a diferentes estímulos, novos adipócitos podem ser gerados mais rapidamente em alguns depósitos de gordura do que em outros. A localização do tecido adiposo pode determinar o seu metabolismo e função. Em humanos o tecido adiposo localizado na região abdominal (omental) tem sido associado a doenças metabólicas, já

o tecido adiposo marrom e subcutâneo são considerados protetores da homeostase energética, e possui capacidade de secreção de adipocinas e armazenamento de lipídeos. Os pré-adipócitos derivados de tecido subcutâneos tem capacidade de replicação mais extensa quando comparados ao tecido adiposo omental (TCHKONIA et al., 2013), além de apresentar maior expressão de receptor ativado por proliferação de peroxissoma gama (PPAR γ) e CEBP α , e menor ocorrência de apoptose em resposta ao fator de necrose tumoral- α (TNF- α), quando comparado ao tecido adiposo omental humano (TCHKONIA et al., 2013).

Além das alterações em decorrência da localização do tecido adiposo, há também diferenças na estrutura e funções do tecido adiposo. A literatura descreve diferentes tipos de tecido adiposo como marrom, bege e branco. O tecido adiposo branco contém adipócitos formados por grandes gotas lipídicas uniloculares, com função endócrina ativa que regula diversas atividades, como sensibilidade à insulina, metabolismo lipídico e saciedade. Em contraste, o tecido adiposo marrom (TAM) é composto por múltiplas gotas lipídicas, contém um grande número de mitocôndrias, responsáveis pela coloração marrom do tecido, participa da termogênese e localiza-se nas regiões paravertebral, supraclavicular e peri-adrenal. Na diferenciação celular do TAM, os progenitores expressam moléculas similares ao músculo esquelético como fator miogênico 5 (MYF5) e Pax7, que não são expressas no tecido adiposo branco (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; TCHKONIA et al., 2013). Já o tecido adiposo branco após exposição prolongada ao frio ou em resposta à sinalização β -adrenérgica pode exibir características do TAM, como o aumento da UCP1 e gotículas de lipídios, sendo denominado tecido adiposo bege, que apresenta características intermediárias entre o tecido adiposo marrom e branco, e está associado com melhora do perfil metabólico em resposta à dieta hiperlipídica.

O tecido adiposo é um órgão endócrino complexo que atua na homeostase energética respondendo rapidamente e dinamicamente a alterações na privação e excesso de nutrientes (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Além de adipócitos, o tecido adiposo (TA) possui também macrófagos, linfócitos, fibroblastos, progenitores celulares e células endoteliais, e ainda secreta moléculas como leptina e adiponectina, citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e reguladores vasculares (angiotensina II e inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1)) (ANDERSEN, C. J.; MURPHY, K. E.; FERNANDEZ, M. L. 2016). Na obesidade, o TA pode se tornar severamente disfuncional e, assim, alterar a nível tecidual, o seu tamanho, função e distribuição em

todo o corpo. A nível tecidual, modifica a matriz extracelular (MEC), vascularização, níveis de estresse oxidativo, perfil de adipocinas secretadas e o estado inflamatório das células imunes infiltradas (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). A modificação MEC pode ser um fator limitante da capacidade de expansão para armazenamento de energia excedente acometendo em hipertrofia dos adipócitos (armazenamento de lipídeos excedente em adipócitos pré-existentes), em vez da hiperplasia (aumento do número de adipócitos por meio do recrutamento de pré-adipócitos residentes) (JO et al., 2009). A saturação da capacidade hipertrófica dos adipócitos em armazenar lipídeos excedentes proporciona o aumento da concentração de ácidos graxos livres (FFA) (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011).

Em circunstâncias normais, o tecido adiposo é considerado um tecido conjuntivo de baixa densidade e com alta plasticidade. No entanto, no estado obeso, o conteúdo de fibras conectivas do tecido adiposo aumenta, principalmente o colágeno VI (KHAN et al., 2009), tornando a MEC mais rígida e com menor capacidade de expandir para depositar lipídeos excedente, o que aumenta também a concentração de FFA e o depósito de lipídeos de forma ectópica em órgãos como fígado, músculo esquelético e o pâncreas endócrino, resultando em desequilíbrio metabólico e lipotoxicidade (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011)(KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

Pesquisa realizada por Khan e colaboradores mostraram que animais que não tinham colágeno VI na MEC que envolve o tecido adiposo, quando alimentados com dieta rica em lipídeos ou animais *ob/ob*, apresentaram um melhor *clearance* de glicose, redução do acúmulo de gordura ectópica com aumento do tamanho adipócitos resultando em um tecido adiposo menos denso e menos estruturado, o que favorece as taxas de sobrevivência dos adipócitos (KHAN et al., 2009). Além disso, a ausência de colágeno VI também resultou em níveis reduzidos de elastina, uma molécula-chave na elasticidade da MEC, cuja principal função é auxiliar na contração celular permitindo que após expansão a célula volte ao seu tamanho original. Nos adipócitos, a redução da elastina sugere que estes são capazes de se expandir com menos tensão, o que favorece o aumento do tamanho do adipócito. Vias metabólicas como das quinases reguladoras envolvidas na tensão de cisalhamento, como a ERK e JNK, foram significativamente reduzidas no adipócito na ausência colágeno IV, o que também reduz a tensão de cisalhamento na membrana e torna a MEC mais flexível reduzindo as restrições devido fibrose do ambiente extracelular, permitindo maior plasticidade e minimiza o estoque de lipídios de forma ectópica (KHAN et al., 2009).

Já em modelos animais o consumo de uma dieta rica em lipídeos, proporciona hipertrofia dos adipócitos criando um estado de hipóxia local, aumentando a concentração do fator induzido por hipóxia 1(HIF1 α) no TA (HALBERG et al., 2009). O HIF1 α é o principal regulador da resposta a hipóxia e foi investigado inicialmente na biologia do tumor. Seu efeito indutor da angiogênese em resposta à hipóxia de genes alvo, como VEGF α e angiopoietina 2, permite ao tumor estabelecer um microambiente oxigenado e enriquecido nutricionalmente. Porém no tecido adiposo ao contrário do que acontece no tumor o HIF1 α é incapaz de induzir a angiogênese. Halberg *et al.*,2009, observou que em animais *ob/ob* os níveis elevados de HIF1 α falharam ao induzir a expressão de VEGF α o que pode contribuir para menor vascularização do tecido adiposo observada nestes animais (HALBERG et al., 2009).

O HIF1 α por sua vez estimula uma série de fatores extracelulares, como colágenos (I, IV e VI) (SUN et al., 2013), que contribuem para a fibrose do tecido adiposo. Outro fator que regula positivamente a deposição de colágeno fibrilar é a expressão genica do lisil-oxidase (LOX) geralmente aumentada em situações disfuncionais do tecido adiposo, como na obesidade ou exposição à endotoxina, que também exerce um papel no remodelamento dos adipócitos (WEINBERG; SENA; CHANDEL, 2015). A soma destas alterações contribui para a rigidez da MEC e hipóxia do TA contribuindo para o estresse celular e para alterações metabólicas proeminentes da obesidade. Ainda, na obesidade ocorre o estresse do retículo endoplasmático (RE) do adipócito que causa hiposecreção de adiponectina e aumento da lipólise (TORRE-VILLALVAZO et al., 2018), que contribui para resistência à insulina, disfunção endotelial e aterosclerose.

A adiponectina é quase exclusivamente secretada por adipócitos e apresenta propriedades anti-apoptóticas (HOLLAND et al., 2010), anti-inflamatórias e aumenta a sensibilidade à insulina (YE; SCHERER, 2013; HOTTA et al., 2000). Camundongos que super-expressam adiponectina são protegidos contra intolerância à glicose induzida por dieta hiperlipídica (HFD) e dislipidemia. Além da adiponectina, a leptina outro hormônio secretado pelo tecido adiposo, apresenta produção diretamente proporcional a quantidade de massa gorda e comunica o estado energético do organismo ao cérebro, por meio de receptores específicos no hipotálamo e na periferia. Os sinais da leptina influencia numerosos processos biológicos, como saciedade, gasto energético, função reprodutiva e diferenciação de células Tregs. Em roedores, a deficiência em leptina (*ob/ob*) ou do receptor de leptina (*db/db*) resulta na ausência ou falha da sinalização

induzida pela leptina acometendo o apetite e a conservação de energia resultando em um quadro de obesidade por excesso de consumo alimentar (PUCINO et al., 2014).

Resposta Imune na Obesidade

Ao considerar a resposta imune na obesidade, há aumento da secreção de citocinas produzidas pelos adipócitos, tais como TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, leptina e resistina, com uma redução paralela de IL-10 e adiponectina, que influenciam na caracterização de um estado inflamatório de baixa intensidade (CINTI et al., 2005; HERSOUG; LINNEBERG, 2007; KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Em adição, devido ao aumento de FFA, ocorre ativação de vias de sinalização como as do IKK β e NF- κ B, e das vias dos *receptores do tipo Toll* (TRL) (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011; CHIANG et al., 2009), que também influenciam no estado inflamatório.

Hotamisligil e colaboradores mostraram que os níveis de TNF- α estão aumentados em camundongos obesos (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993a) e trabalhos posteriores correlacionaram positivamente o tamanho dos adipócitos e a concentração de TNF- α (WINKLER et al., 2003). O TNF- α também favorece a via de ativação do NF- κ B, o estímulo da via de sinalização da morte celular, atua inibindo a expressão do transportador de glicose GLUT-4 e induz o aumento os níveis de FFA reduzindo a sensibilidade à insulina (GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2016).

Outro aspecto importante que ocorre na obesidade é a alteração da microbiota intestinal, aumento da permeabilidade intestinal e aumento na concentração de bactérias ou produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) na circulação sanguínea, que também ativam os TLRs em especial o TLR4 (WINER et al., 2016). Estas vias de sinalização regulam a fosforilação de proteínas e conduzem ao aumento na produção de moléculas como o TNF- α , IL-6, leptina, resistina e quimiocinas como receptor de quimiocina CC tipo 2 (CCR2) que está envolvida na migração de monócitos.

Em condições normais, os macrófagos produzem mediadores como TNF- α , IL-1 β e IL-10, com até 50% destes produzindo IL-10, o que contribui para a remodelação tecidual, recrutamento de mais monócitos e interação com células imunes locais, como células T e ILCs, isso sem necessariamente a ocorrência de inflamação. Em adição, a produção de IL-10 por macrófagos residentes impulsiona expansão secundária e sobrevivência de células Tregs FoxP3⁺. Já no estado obeso, os níveis

aumentados de mediadores inflamatórios, como FFA, LPS e citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ) atuam diretamente na diferenciação de monócitos Ly6C^{hi} em CD11b⁺CD64⁺F4/80⁺CX3CR1^{int} imaturos dependente CCR2 que apresentam características mais pró-inflamatórias, o que favorece também a migração de monócitos da medula óssea para o TA (GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2016).

Monócitos e macrófagos imaturos são os principais produtores de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-23, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) que causam dano tecidual e podem promover a diferenciação de células T *naive* em células Th1 e Th17, produtoras de IFN- γ e IL-17, por meio da produção de IL-12 e IL-6, respectivamente (SEO et al., 2015; GEIGER, 2015; SCHREIBER et al., 2013). Na obesidade, os monócitos podem não se diferenciarem completamente para se tornarem macrófagos maduros, assim, não regulam a produção de IL-10 ou deixam de responder ao seu estímulo (WOLTMAN; REYAL; BONNET, 2012). Já os macrófagos maduros (CD11b⁺CD64⁺F4/80⁺CX3CR1^{hi}) possuem baixa expressão de citocinas pro-inflamatórias e secretam IL-10, porém são menos frequentes no TA durante a obesidade (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

Tem sido demonstrado que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, apresentam maior número de TCD4⁺, TCD8⁺ e níveis superiores de IFN- γ e TNF- α quando comparados aos homólogos magros, principalmente no TA (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). A infiltração de TCD8⁺ no TA precede o acúmulo de macrófagos CX3CR1^{int}, que migram em direção ao TA em resposta a maiores quantidades de FFA, glicose e apoptose, aumentando a inflamação. Esse cenário contribui para a produção de citocinas pró-inflamatórias, liberação de proteína quimiotática de monócitos 1 e 3 (MCP-1) e MCP-3, que cria um ciclo de recrutamento celular contínuo e inflamação constante no TA (NISHIMURA et al., 2009).

Além das alterações no TA, a obesidade favorece o depósito de lipídeos em tecidos ectópicos que acomete também a arquitetura e funcionalidade em órgãos primários e secundários do sistema imune, incluindo a medula óssea, o timo e os linfonodos (YANG et al., 2009). Na medula óssea o acúmulo de lipídeos reduz a hematopoiese e no timo a timopoiese, somada a uma diversidade restrita de repertórios de receptores de células T no timo (YANG et al., 2009). Já a resposta imune periférica, na obesidade ocorre redução da migração de células apresentadoras de antígenos (APCs) para linfonodos periféricos e consequente diminuição da diferenciação de linfócitos T. Essas alterações levam a disfunção dos órgãos imunes, distribuição

inadequada das populações de leucócitos e modificação na atividade dos linfócitos, o que pode afetar a resposta imune contra patógenos, a regulação da resposta imune aos antígenos da dieta e da microbiota e resultar em disbiose. Isso, pode comprometer principalmente a mucosa intestinal, onde há contato contínuo dos antígenos da dieta e da microbiota intestinal com o sistema imune (ANDERSEN; MURPHY; FERNANDEZ, 2016).

O Tecido Linfoide Associado à Mucosa Intestinal (GALT)

No intestino há aproximadamente 10^{12} células linfoides por metro de intestino delgado, somados ao número de células secretoras de imunoglobulina (Ig), isso tanto no intestino humano e tanto no murino. Esse número de células excede o número encontrado em todos os outros órgãos linfoides juntos (MUCIDA et al., 2004; REZENDE; WEINER, 2017). Essas características fazem do intestino o maior compartimento imune do corpo, encarregado de fornecer resistência à toxinas e patógenos invasores, mantendo a tolerância aos antígenos da dieta e da microbiota (MOWAT, 2018; FARIA; WEINER, 1999).

Os intestinos delgado e grosso diferem acentuadamente em tamanho. O intestino delgado em seres humanos consiste em múltiplos espirais e possui 6 a 7m de comprimento; o cólon é mais largo em diâmetro e mais curto (~1,5 m) (MOWAT; AGACE, 2014). Quanto a estrutura, o intestino delgado é caracterizado por vilosidades que possuem borda em escova, o que proporciona aumento da área absorptiva e digestiva, principalmente no duodeno e jejuno. A presença de antígenos da dieta influencia no desenvolvimento e na maturação da mucosa intestinal. Camundongos adultos mantidos, desde o desmame, sob dieta livre de proteínas, contendo apenas aminoácidos, apresentam alterações na maturação dos órgãos linfoides associados a mucosa similares aquelas observadas em camundongos livres de germes (GF) (MENEZES et al., 2003; SILVA et al., 2010). Já o intestino grosso é composto pelo ceco e colón, não possuem vilos e a mucosa consiste principalmente de pequenas criptas e regiões do epitélio de superfície plana. Em contraste, os vasos linfáticos lácteos que drenam a mucosa do cólon parecem não diferir em camundongos GF, sugerindo que sua organização estrutural é independente da microbiota. A principal função do colón descrita é reabsorver a água das fezes e agir como uma barreira à microbiota comensal, que é auxiliado pelo grande número de células caliciformes, que produzem uma camada extensa e espessa de muco protetor (MOWAT; AGACE, 2014).

O epitélio intestinal é composto por enterócitos, células de Paneth, células caliciformes e células neuroendócrinas. As células de Paneth possuem papel antibacteriano crucial, produzem peptídeos como lisozima e defensinas, que são encontradas apenas no intestino delgado, onde estão particularmente concentradas no íleo. A concentração de células caliciformes produtoras de muco aumenta progressivamente, ao longo do trato gastrointestinal. A produção de muco é controlada por mediadores imunes, incluindo leucotrienos, IFN- γ , IL-9 e IL-13. O muco tem papel antimicrobiano, formando um gel de alta carga que atua como uma barreira física, além de ser composto de glicoproteínas de mucina que são diretamente tóxicas para muitas bactérias (MOWAT; AGACE, 2014).

Associado ao GALT, existem vários órgãos linfóides, como as placas de Peyer (PP), o tecido linfóide solitário (SILTs) e os linfonodos mesentéricos (LNMs). Ainda no GALT, há células imunes dispersas, como os linfócitos intraepiteliais (IEL), os linfócitos da lâmina própria (LPL) e dos gânglios linfáticos. Os SILTs variam em tamanho desde pequenas criptas, até folículos linfóides isolados (ILFs). Em contraste com as placas de Peyer, os ILFs possuem principalmente células B sem zona de células T claras, eles contêm centros germinativos, o que é indicativo de ativação imune humoral contínua. Assim, os ILFs têm sido considerados como importantes sítios de troca de classe de IgA independente de célula T em camundongos (PABST et al., 2005).

Na parte central das vilosidades compreende-se a lâmina própria, que possui vasos sanguíneos e vasos linfáticos que se comunicam com os linfonodos mesentéricos (LNMs), e muitas células do sistema imune inato e adaptativo. Os LNMs são locais críticos para estabelecer a imunidade adaptativa às perturbações luminiais, incluindo geração periférica eficiente de células T efetoras e células T reguladoras FOXP3⁺ (pTreg). Devido a presença de células com localização e função imune distinta ao longo do intestino, os LNMs agem como sítio comunicador entre a mucosa que drenam e as vias de recirculação (via linfáticos aferentes) periférica, permitindo a mobilidade de células como as células dendríticas (DCs) (ESTERHÁZY *et al.*, 2016). Esterházy e colaboradores (ESTERHÁZY *et al.*, 2018) mostraram que os LNMs duodenais apresentam características mais tolerogênicas devido às assinaturas das DCs que possuem (CD103⁻CD11b⁺ e CD103⁺CD11b⁺) e a capacidade de digestão e absorção de nutrientes, e que estas características são impulsionadas pela microbiota. A absorção de retinol realizada no duodeno é espelhada nos LNMs duodenais dependente da via linfática, sugerindo que a rota linfática compartimentada transmite nichos distintos ao

longo do intestino para os órgãos linfoides, contribuindo para a regionalização da resposta imune da mucosa intestinal. Além disso, a diferenciação em células Tregs diminuem ao longo dos LNMs intestinais, de maneira distal para proximal. Os LNMs duodenais são os locais primários para a indução de células Treg FOXP3⁺ pelos antígenos da dieta, o que sugere que este sítio anatômico pode ser útil na prevenção da intolerância alimentar ou da alergia.

Os receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e a dano celular (PAMPs e DAMPs) expressos nas células epiteliais, são reconhecidos pelas APCs presentes no GALT, por receptores específicos, tais como TLR e os receptores do tipo NOD (NLR), que são capazes de agir como sensores intestinais que, quando ativados participam do direcionamento da resposta imune no intestino, levando à secreção de citocinas e à ativação ou recrutamento de APCs e de linfócitos. A ativação desses receptores em condições de homeostase intestinal tem um papel protetor que contribui para o reparo e manutenção da microbiota, caracterizado pelo aumento de muco, defensinas, TGF- β , IL-10, IL-22 e secreção luminal de IgA (EDBERG et al., 2015).

Outro fator que contribui para a homeostase intestinal é a manutenção do equilíbrio da microbiota. Adicionado ao papel antigênico desencadeado pelas proteínas da dieta, a microbiota intestinal é um estimulador antigênico natural que contribui para a homeostase e aumento da produção de IgAs (WEINER et al., 2011). Esta é composta por diferentes espécies de bactérias, vírus e fungos. As bactérias residem de forma subjacente à monocamada das células epiteliais, o que favorece a homeostase entre a tolerância e a imunidade do intestino (BOLLRATH; POWRIE, 2013). Alterações na barreira intestinal e a disbiose no intestino de obesos, pode contribuir para a ocorrência de alguma perturbação do equilíbrio do sistema o que favorece uma disfunção no organismo de forma a favorecer o desenvolvimento de doenças, bem como dificultar a tolerância imune aos antígenos da dieta e da microbiota (FARIA; WEINER, 2005, 1999; SPIEKERMANN; WALKER, 2001).

Na obesidade, várias alterações são observadas na mucosa intestinal; dentre elas, a disbiose da microbiota, aumento da permeabilidade intestinal, translocação de bactérias e elevação dos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) provenientes da microbiota na circulação sistêmica. Essas alterações aumentam o infiltrado celular presente nesse sítio assim como a exposição aos antígenos da dieta e da microbiota, amplificam o contato entre o LPS e outros padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) com

os TLRs, principalmente o TLR4 (WINER et al., 2016; GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2016) abundantemente expresso em células da mucosa intestinal. As interações de antígenos bacterianos com esses receptores podem desencadear a ativação de vias de sinalização inflamatórias como a do NF- κ B que, de fato, está aumentada em camundongos obesos. Luck e colaboradores (LUCK et al., 2015) investigaram os efeitos da obesidade induzida por dieta na imunidade intestinal e mostraram que, após 12 a 16 semanas de consumo de dieta hipercalórica, ocorreram mudanças no perfil das células do sistema imune tanto no intestino delgado, como no cólon. Ambos apresentaram aumento na frequência e no número absoluto de células Th1 produtoras de IFN- γ e células TCD8⁺ e redução na proporção de Tregs CD4⁺Foxp3⁺, quando comparadas a camundongos magros. Ao avaliar a proporção em número relativo de células T-bet⁺, células T Foxp3⁺ e células TCD8⁺ na LP de espécimes de ressecção do cólon e do íleo de humanos obesos (IMC>30cm²), esses autores observaram resultados semelhantes aos encontrados em camundongos.

Diante dessas alterações na mucosa intestinal e na resposta imune acometida pela obesidade, nossa hipótese de trabalho foi que tais mudanças inflamatórias desencadeadas pela obesidade poderiam afetar a indução de um fenômeno imunorregulador importante para a homeostase do intestino e do sistema imune que é a tolerância oral induzida na mucosa aos antígenos da dieta.

A Tolerância Oral e as repercussões da obesidade na mucosa

Em 1911, Wells e Osborne (WELLS H.G; OSBORNE T.B., 2016) mostraram que a administração oral de proteínas, como a ovalbumina (OVA), previnía reações anafiláticas subsequentes a essa proteína em cobaias. Décadas mais tarde, outros pesquisadores descreveram que a administração oral de antígenos resulta na indução de supressão da imunidade sistêmica humoral e celular ao antígeno administrado, reduzindo os níveis de anticorpos e também reações mediadas por linfócitos específicos (VAZ et al., 1977). O desenvolvimento de tolerância pela via oral previne reações de

hipersensibilidade tardia (DTH) mediadas por células T, respostas dependentes de imunoglobulina E (IgE) e produção de citocinas (DA SILVA MENEZES et al., 2003; SILVA et al., 2010; WEINER, 1994).

Estudos prévios abordavam uma dicotomia na susceptibilidade de subtipos de linfócitos T auxiliares à indução de tolerância oral em que havia ativação preferencial de células Th2 e consequente produção de citocinas, como IL-4 e IL-10, após o contato com o antígeno, com uma supressão das respostas tipo Th1 ou vice-versa (MILLER et al., 1992; MILLER et al., 1994). Adicionalmente, a produção de anticorpos IgG1, dependente de IL-4, seria mais resistente a tolerância do que as respostas de IgG2a, dependentes de IFN- γ (MELAMED e FRIEDMAN, 1994; CLAESSEN, VON BLOMBERG et al., 1996). No entanto, estudos subsequentes sugerem que ambos Th1 e Th2 podem ser suprimidas durante a indução de tolerância oral (GARSIDE et al., 1995). Russo *et al.* 1998 (RUSSO et al., 1998) descreveram que a administração prévia de OVA por 5 dias consecutivos foi capaz de bloquear a eosinofilia pulmonar, produção de IgE e reatividade pulmonar AHR, fenômenos típicos de envolvimento de linfócitos tipo Th2 que levam ao desenvolvimento da asma.

Outro fator importante a ser considerado é que todos os aspectos inflamatórios das respostas imunes podem ser inibidos pela tolerância oral, mas em graus distintos. Assim, respostas Th2 são mais facilmente inibidas em imunizações com adjuvantes polarizadores para resposta Th2, como o hidróxido de alumínio em modelos animais (TOBAGUS; THOMAS; HOLT, 2004), enquanto imunizações parenterais com adjuvante completo de Freund (CFA) revelam maior inibição de respostas Th1. Em contraste, é relevante considerar que a produção de IgE é particularmente suscetível à inibição pela administração oral do antígeno e posterior imunização com Al(OH)₃ (VAZ et al., 1997).

Vários fatores interferem na indução da TO como frequência, dose e forma de administração do antígeno, a imunização e o adjuvante, por exemplo. Nosso grupo demonstrou que a ingestão contínua do antígeno é mais eficiente na indução da tolerância imune em modelos de doença inflamatória autoimune, quando comparada a administração única ou múltiplas por gavagem (FARIA et al., 1998). Oliveira, 2015 (OLIVEIRA et al., 2015) e Faria 2003 (FARIA et al., 2003) demonstraram que a forma de administração do antígeno continua é mais eficiente na inibição de ambas as respostas, celular e humoral, ao antígeno e está relacionada à maior produção de TGF- β e de IL-10, citocinas importantes no desenvolvimento da TO.

Embora vários mecanismos tenham sido propostos para explicar a indução de tolerância oral (anergia, deleção, desvio imune), atualmente existe um consenso de que o fenômeno depende da ação de células T reguladoras (Tregs) induzidas na mucosa intestinal.

As células T reguladoras (Tregs) CD4⁺Foxp3⁺ constituem cerca de 5 a 20% das células TCD4⁺ e são essenciais para a regulação da resposta imune principalmente no contexto da tolerância oral (TO), alergia, infecções e autoimunidade (COOMBES et al., 2007a; MUCIDA et al., 2005a). A mucosa intestinal abriga uma grande população de Tregs que desempenham papel importante na manutenção da homeostase (BOLLRATH; POWRIE, 2013). As células T reguladoras foram descritas como uma população de células TCD4⁺ por Sakaguchi e colaboradores (SAKAGUCHI et al., 1995b), que demonstraram que essas células expressam constitutivamente a cadeia α do receptor da IL-2. Posteriormente, foi identificado o fator de transcrição Foxp3 (forkhead box P3), que é capaz de conferir propriedades reguladoras a essa população linfóide (HORI, 2013). As células reguladoras autorreativas segundo Sakaguchi *et al* (SAKAGUCHI et al., 1995a), são geradas no timo sendo chamadas de células reguladoras naturais (nTreg). Já as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reativas a antígenos externos geradas em órgãos linfóides da periferia a partir de células T naïve, são chamadas de células reguladoras induzidas (iTreg), sendo o intestino um sítio privilegiado para a indução dessas células. A presença da molécula neuropilina 1 na superfície das nTreg é capaz de diferenciá-las das iTregs (WEISS et al., 2012). Um dos principais mecanismos subjacentes às ações das células Tregs incluem a produção de citocinas inibitórias (IL-10 e TGF- β), citólise de células efetoras (liberação de granzima e perforina) (CAO et al., 2007) e moléculas de superfície celular CTLA-4 (molécula citotóxica associada aos linfócitos T-4) (TAKAHASHI et al., 2000). Além das células Tregs Foxp3⁺, várias subpopulações de linfócitos T com fenótipo regulador induzido na periferia são importantes na indução de imunossupressão, tais como: Tr1 e Th3 (WEINER et al., 2011; FARIA; WEINER, 2006b). Esses subtipos de células Treg medeiam sua ação pela secreção das citocinas IL-10 e TGF- β respectivamente.

O TGF- β é uma citocina multipotente importante na modulação do crescimento celular, inflamação, síntese de matriz e apoptose. Foi identificada como uma molécula com propriedades imunogênicas e imunossupressoras, dependendo do ambiente celular. Além disso, apresenta importante papel na regulação de respostas

imunes mediadas por células T e na indução de tolerância imune (MANUSCRIPT; STRUCTURES, 2009). A geração de células Treg induzidas na periferia também é promovida pela presença de TGF- β , que pode ser convertida a partir da sua forma latente e inativa (iTGF β) para a citocina ativa (aTGF β) por meio da ação da integrina $\alpha\beta 8$ expressa seletivamente pelas DCs CD103⁺CD11b⁻ (SILVA et al., 2010). A deleção do subconjunto $\alpha\gamma$ ou $\beta 8$ das DCs resulta em falha na geração de Tregs intestinais e subsequente desenvolvimento de colite sob condições homeostáticas. A $\alpha\beta 8$ é expressa predominantemente em DCs dos LNMs e da lâmina própria intestinal que expressam a integrina $\alpha E\beta 7$ da mucosa (CD103⁺), conferindo a essas células sua capacidade preferencial de ativar o TGF- β e gerar Tregs (FARIA; WEINER, 2006b).

Muitas células imunes produzem TGF- β (predominantemente a isoforma de TGF- $\beta 1$), como macrófagos, enterócitos e DCs, ligado de forma não covalente a um pró-peptídeo N-terminal associado a latência (LAP), impedindo a ligação ao seu receptor de TGF- β (ANNES, 2003). Existe uma população de células reguladoras importantes na TO, que são células TCD4⁺ que expressam em sua superfície LAP após a ativação, e secretam TGF- β , IL-4 e IL-10, foram identificadas como células supressoras em estudos de modelos murinos de inflamação intestinal e denominadas Th3 (WEINER et al., 2011). Antes da identificação do papel das Tregs, a regulação da função das células T na TO era proposto um paradigma entre a resposta do tipo T auxiliar 1 (Th1) ou Th2. No entanto, o paradigma foi mudado ao longo do tempo com outros achados como a população de células TCD4⁺ secretoras de TGF- β que foi associada à TO. Quando as células de camundongos alimentados e imunizados com proteína da bainha de mielina (MBP), verificou-se que tanto as células TCD4⁺ como as TCD8⁺ secretavam TGF- β , enquanto apenas as células TCD4⁺ segregavam IL-4 e IL-10. Porém, as células Th3 que secretaram TGF- β eram diferentes das células clássicas do tipo Th2 (WEINER, 2001b). Como as células Th3 foram descritas antes da descoberta do fator de transcrição Foxp3 como marcador essencial para a função das células iTreg que compartilham muitas propriedades supressoras com células Th3, é possível que essas células possam dar origem umas às outras dependendo do ambiente onde elas encontram o antígeno (REZENDE; WEINER, 2017).

Além disto, o TGF- β pode induzir a expressão de LAP na superfície de células T CD4⁺ independentemente da indução de Foxp3. O mecanismo supressor pelo qual essas células inibem a reatividade inflamatória de outros linfócitos ocorre através da liberação de TGF- $\beta 1$. Em linfócitos B, promove, a troca de isotipo de imunoglobulinas

para IgA e é fundamental na homeostase do intestino e de todo o corpo já que camundongos geneticamente deficientes em TGF- β 1 morrem logo após o nascimento devido à doença inflamatória generalizada (SHULL et al., 1992). O bloqueio de TGF- β 1 por anticorpos anti-TGF- β reduz a capacidade das células Th3 de suprimir a proliferação de células TCD25⁺ e a produção de Ig de células B *in vitro*. A produção aumentada de TGF- β 1 foi detectada em diversos estudos sobre tolerância oral, o que indica a sua grande importância no desenvolvimento desse fenômeno (FARIA; WEINER, 2006b).

As DCs CD103⁺ também participam da geração de Tregs intestinais, o que tem sido atribuído à sua capacidade de metabolizar o ácido retinóico (AR), que promove a geração de Treg na presença de TGF- β (MUCIDA et al., 2007; AGACE; PERSSON, 2012). O AR apresenta efeito imunomodulador e é produzido por meio de oxidação enzimática, sendo a principal isoforma a retinaldeído desidrogenase 2, codificada pelo gene *Aldh1a2*, que é expresso pelas DCs. Na LP e nos LNMs as DCs CD103⁺ expressam quantidades mais elevadas de RNAm de *Aldh1a2*, que por sua vez exibem atividade aumentada de aldeído desidrogenase (ALDH) que induzem a metabolização de AR (HILL et al., 2008a). Além disso, DCs dos LNMs na presença de AR, são capazes de aumentar a expressão dos receptores de quimiocina CCR9 e da integrina $\alpha\beta$ 7 em resposta a células T, na presença de TGF- β convertendo células T naive em células Tregs Foxp3⁺, enquanto suprime a diferenciação de células Th17 dependente de TGF β (MOWAT, 2018; HILL et al., 2008b; MATTEOLI et al., 2010). Além disto, as DCs intestinais são de natureza heterogênea, sendo classificadas como “cDC1s” as que apresentam fenótipo CD103⁺CD11b⁻SIRP α ⁻ e são dependentes do fator de transcrição IRF8 e BATF3 e “cDC2s” as DCs CD103⁺CD11b⁺SIRP α ⁺ e CD103⁺CD11b⁻SIRP α ⁺, dependentes do fator de transcrição IRF4. Ainda não está claro qual desses subconjuntos de DCs são responsáveis pela tolerância oral, embora resultados muito recentes sugiram que o CD103⁺CD11b⁻ dependente de IRF8 não estão envolvidas na captação de antígenos solúveis no intestino delgado, porém parecem ser o subconjunto mais eficiente na indução de Tregs Foxp3⁺ *in vitro* via metabolização de AR e este também é o único subconjunto de DCs da mucosa que pode ativar o TGF- β via expressão da integrina $\alpha\beta$ 8 (SCOTT; AUMEUNIER; MOWAT, 2011).

Outro papel importante das DCs na indução da TO é a captação de antígenos solúveis da dieta. A captação de antígeno ocorre por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo as células M associadas as placas de Peyer, pelas células

epiteliais colunares ou por DCs que capturam os antígenos associados a células caliciformes, indiretamente através de células das vilosidades ou após transferência de tecido-residente. Em geral as DCs CD103⁺ parecem ser mais competentes que os macrófagos CX₃CR1⁺ na coordenação da imunidade adaptativa aos antígenos no intestino, por expressarem o receptor de quimiocinas CCR7, permitindo que migrem para os LNMs, carregando antígenos da dieta e de bactérias encontradas no intestino (NIESS et al., 2005). Foi observado que DCs CD103⁺ estendem seus dendritos transepiteliais (TEDs) para terem acesso às bactérias luminais, capturando diretamente os patógenos (NIESS et al., 2005). Farache e colaboradores (FARACHE et al., 2013a), desafiaram camundongos com bactéria *Salmonella typhimurium* e identificaram recrutamento de DCs CD103⁺ da LP para o epitélio intestinal, mostrado por microscopia de dois fótons e posteriormente confirmado por meio análise imuno-histológica. Para acessar os antígenos localizados no lúmen intestinal, os dendritos das DCs devem romper as junções firmes que selam a barreira epitelial na superfície luminal (RESCIGNO et al., 2001), para isso, a expressão de proteínas de junções firmes também nas DCs poderia auxiliar na mobilidade pela membrana. As proteínas Claudina-4 e Zonulina-2 já foram identificadas em DCs CD103⁺ (assim como em macrófagos CX₃CR1⁺) examinadas por PCR em tempo real (FARACHE et al., 2013b).

As células apresentadoras de antígenos (APCs) do intestino são cooperativas para o estabelecimento da TO. A captura de antígenos solúveis da dieta pode ser realizada por macrófagos CX₃CR1⁺ e pelas células epiteliais, mas não por DCs CD103⁺. Apesar da capacidade de apresentação de antígeno das DCs CD103⁺, não se encontrou OVA inteira nestas células. Assim, Mazzini *et al*, 2014(MAZZINI et al., 2014) mostrou que a ingestão de antígeno por células CX₃CR1⁺ pode resultar em eventual transferência para DCs CD103⁺. Em camundongos com deficiência de CX₃CR1⁺, ocorre comprometimento das DCs CD103⁺ em adquirir o antígeno. Isso indica indiretamente que as DCs CD103⁺ não adquirem o antígeno de outras células se não de macrófagos CX₃CR1⁺. Hadis e colaboradores (HADIS et al., 2011), mostraram que a deficiência de células que expressam CX₃CR1⁺ resulta em defeitos no estabelecimento no estabelecimento da TO devido à incapacidade dos macrófagos em produzir IL-10 e de estimular as células T reguladoras. Além disso, camundongos que apresentam ausência de conexina 43 (Cx43) apenas em APCs não foram capazes de desenvolver TO em resposta à administração oral de OVA. Isso se correlacionou com a incapacidade das DCs CD103⁺ em adquirir o antígeno *in vivo* e apresentá-lo às células T. Assim parece

que a transferência de peptídeos antigênicos depende da expressão de Cx43 em APCs (MAZZINI et al., 2014).

Os enterócitos também podem capturar e internalizar antígenos, por meio de complexos antígeno-anticorpo com ação do receptor de imunoglobulina G (IgG) neonatal (FcRn) em sua superfície e transportá-los ao epitélio por transcitose. No epitélio as DCs da LP expressam FcRn e outros receptores Fc que capturam e internalizam os antígenos. Já os enterócitos que sofreram apoptose devido à senescência ou após infecção por um patógeno, podem ser fagocitados por DCs próximas. Por fim, células CX₃CR1⁺ também mostraram ser capazes de adquirir antígeno luminal de forma eficiente, e isso pode envolver sua extensão entre as células do epitélio sem perturbar sua integridade.

Após a captura dos antígenos, as DCs migram constitutivamente da linfa aferente para os LNMs drenantes, onde encontram células TCD4⁺ e TCD8⁺ naive. Nos LNMs, a diferenciação de células T dependendo do contexto pode ser em inflamatórias ou tolerogênicas. Acredita-se que as DCs intestinais desempenham um papel central na homeostase imune intestinal, induz tolerância a antígenos inócuos, inicia imunidade protetora contra patógenos intestinais e contribui na patogênese de doenças intestinais, incluindo a doença celíaca e as doenças inflamatórias intestinais (IBD), como doença de Crohn e colite ulcerativa (ASSAY; DENDRITIC, 2016).

Portanto, apesar do progresso na caracterização do sistema imune associado à mucosa e da TO, pouco se sabe sobre os efeitos da obesidade nesse sistema. Poucos trabalhos avaliaram as alterações imunes na indução da TO em camundongos obesos. Mito *et al*, 2006 mostrou uma variação da capacidade de desenvolver TO a antígenos administradas por via oral, mas não utilizaram protocolos similares aos do nosso grupo e não ficou claro os resultados obtidos ao considerar a resposta humoral das Ig específicas (MITO et al., 2006). Além disso, não estão claros os mecanismos pelos quais a obesidade pode interferir na indução de TO para justificar porque a obesidade agrava doenças alérgicas, asma e principalmente doenças inflamatórias intestinais. Diante disso, este trabalho pretende investigar não somente se a obesidade compromete a indução de TO, mas também os mecanismos que levam a esse fenômeno.

2. OBJETIVO GERAL:

Avaliar se a obesidade induzida por dieta interfere na indução da tolerância oral (TO).

1.1 OBJETIVO ESPECIFICOS

- Verificar se a obesidade induzida por dieta é capaz de alterar a homeostase do intestino delgado e das células dendríticas dos linfonodos mesentéricos;
- Avaliar se a obesidade interfere na capacidade de indução de TO ao antígeno administrado por via oral;
- Comparar a produção de anticorpos séricos antígeno-específicos em animais obesos e controles após a indução da TO;
- Comparar a resposta imune celular antígeno-específica em animais obesos e controles após a indução da TO;
- Verificar se a obesidade induzida por dieta interfere na frequência de linfócitos T reguladores nos linfonodos mesentéricos e no tecido adiposo após a indução de TO;

3. HIPÓTESE

A obesidade induzida por dieta interfere na indução da TO.

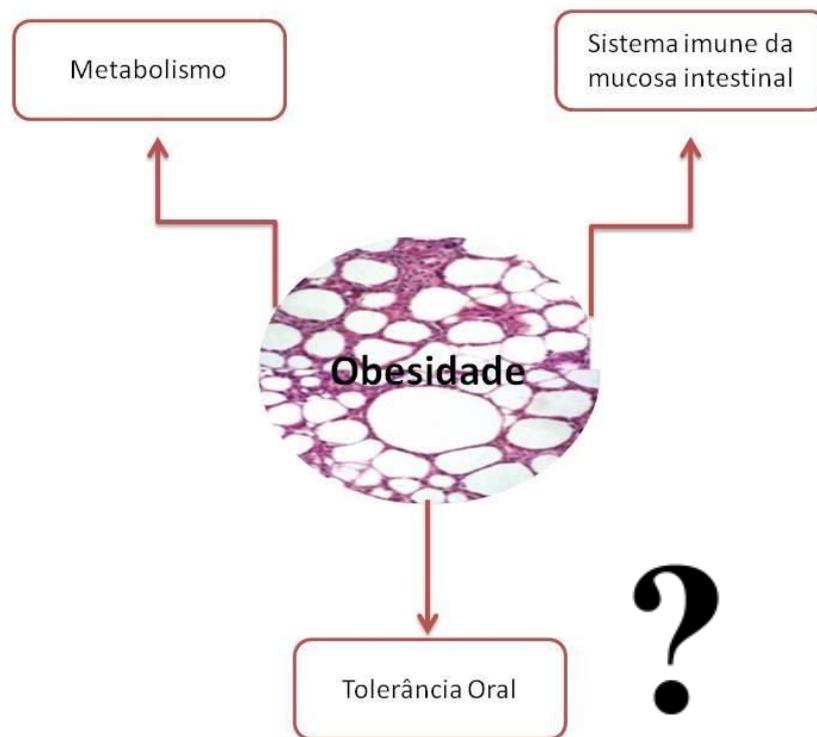


Figura 1: Obesidade induzida por dieta está associada a alterações metabólicas e imunes da mucosa intestinal. Essas alterações podem interferir na indução de TO? Como?

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 e C57BL/6 GFP *knock-in* para Foxp3 machos com idade entre 6 a 7 semanas e com livre acesso à água e alimentação. Os camundongos foram alimentados durante 13 semanas com dieta AIN93G ou dieta experimental contendo alta teor de lipídeos (manteiga) e carboidrato refinados (açúcar) testada previamente em nosso laboratório (High Sugar Butter (HSB)) (MAIOLI, 2016), de forma que simulasse uma dieta hiperlipídica e com alto teor de carboidratos simples (Tabela 1).

A dieta foi ofertada em forma de pelete. A peletização é uma operação de moldagem, na qual partículas são aglomeradas em uma forma compacta. Esta ação reduz o desperdício e facilita a preensão e mastigação do alimento pelo animal (GARCIA-MARAVÉR, 2015).

4.1. Cálculo amostral

Foi realizado o cálculo amostral utilizando a diferença de médias e desvio padrão das variáveis biológicas que foram avaliadas no trabalho como citocinas e imunoglobulinas considerando valores de referência de trabalhos previamente publicados pelo nosso grupo de pesquisa. Considerou o poder de análise para o erro tipo I de 5% e erro tipo II de 10%, determinando o número de 48 animais, divididos em dois grupos diferentes que recebiam dieta AIN93G ou HSB. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) protocolo 335/2017.

4.2. Ingestão Alimentar

A ingestão alimentar foi mensurada durante todo o período do experimento por meio da diferença entre a dieta ofertada e o resto ingestão.

Tabela 1: Composição dietética das dietas utilizadas (AIN93G e HSB)

	AIN93G	HSB
Amido de milho	397,5	208,586
Caseína Láctea	200,0	200,0
Amido Dextrinizado	132,0	0,0
Açúcar cristal	100,0	232,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Celulose MC-101	50,0	50,0
Mix mineral AIN 93G	35,0	35,0
Mix Vitamina	10,0	10,0
L- Cistina	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5
BHT	0,014	0,14
Manteiga Comercial	0,0	188,9
Total (g)	1000,0	1000,0
Kcal/g	3,9	4,9
g de proteína por Kg de peso^a	0,04	0,04
Composição Kcal (%)		
Carboidrato	64	36
Proteínas	20	16
Lipídeos	16	48
Composição Centesimal		
Carboidrato	64	36
Proteínas	20	16
Lipídeos	16	48

^aA quantidade de proteína por grama de peso foi baseada no peso inicial do camundongo, 25g/camundongo considerando ingestão de 5g/dia.

4.3. Peso corporal

Ao longo das 13 semanas avaliou-se o peso corporal dos animais no mesmo dia da semana e horário para reduzir a variabilidade na aferição. Temperatura foi mantida

em aproximadamente 26°C, para proporcionar a manutenção da temperatura corporal dos animais constante de forma a manter a estabilidade do ganho de peso.

4.4. Índice de adiposidade

Os camundongos foram pesados no momento do sacrifício depois de anestesiadas, na sequência retirou o tecido adiposo epididimal e realizou a pesagem do tecido. Na sequência, os dados foram calculados de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice de adiposidade} = \text{peso do tecido adiposo epididimal} / \text{peso corporal}$$

4.5. Teste de Tolerância a Glicose (GTT)

Os camundongos ficaram em jejum por 6 horas e posteriormente foram pesados para que a quantidade de glicose fosse definida individualmente. Foi preconizado um consumo de 2g de D-glicose anidra (Synth) a cada 1Kg de animal. A concentração inicial de D-glicose foi de 0,15mg/mL de água filtrada. A glicemia de jejum dos animais foi mensurada em mg/dL com glicosímetro de tiras (Accu-Chek Performa) e em seguida administrado a solução de glicose por meio de gavagem de acordo com o peso (quantidade de glicose/kg de peso). A glicemia foi medida retirando uma gota de sangue da cauda do camundongo nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos.

4.6. Triglicerídeos e colesterol total

Para aferir os níveis de triglicerídeos e colesterol total sérico utilizou o KIT Bioclin (referência K117 e K083, respectivamente), onde foi marcado três tubos de ensaio branco (B), amostra (A) e padrão (P), adicionou os reagentes segundo instruções do fabricante, homogeneizou as amostras e os reagentes, colocou em banho-maria a uma temperatura de 37°C por 10 minutos e ao término do período de incubação, leu a absorbância das soluções em 500nm. Em seguida, realizou os cálculos utilizando as seguintes equações.

$$\text{Triglicerídeos (mg/dL)} = (\text{Absorbância da Amostra} / \text{Absorbância do padrão}) \times 100$$

$$\text{Colesterol total (mg/dL)} = (\text{Absorbância da Amostra} / \text{Absorbância do padrão}) \times 200$$

4.7. Histologia do Intestino Delgado

Os intestinos dos animais foram retirados após da a eutanásia, e fragmentados em duodeno e colón, fixados em metanol com 20% de DMSO gelado e mantidos a -20°C até o processamento. Após a fixação, o tecido foi desidratado em soluções crescentes de álcoois, clarificado em xilol e banhos de parafina. Logo os tecidos foram incluídos em parafina e realizado cortes histológicos em micrótomo automático de $4\mu\text{m}$ de espessura. Em seguida removeu-se a parafina em estufa a 96°C por 15 minutos, para a coloração com hematoxilina (HE), as lâminas foram lavadas em água corrente, contra-coradas com eosina e imersas em cubas de álcool e de xilol para serem finalmente montadas.

4.8. Morfometria das vilosidades

As imagens do intestino foram capturadas por meio da microcâmara JVC TK-1270/RGB, em aumento de 10x. Os vilos foram medidos, descontando-se as criptas através de lamínula milimetrada como mostra a Figura 2. O resultado foi apresentado pelas médias dos vilos de dez campos/animal.

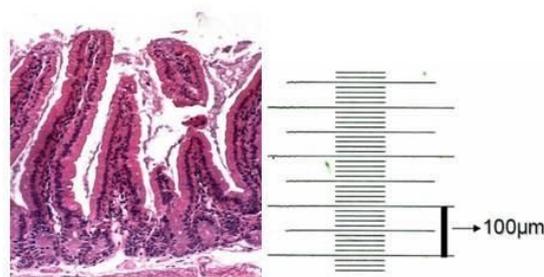


Figura 2: Morfometria dos vilos intestinais. Os vilos intestinais foram medidos e a média do tamanho de 50 vilos por animal foi determinada.

4.9. Contagem de linfócitos intraepiteliais (IEL)

O epitélio intestinal foi examinado em lâminas histológicas coradas com H.E em aumento de 20X em microscópio óptico. Os IEL foram identificados pela sua localização característica: basal em relação aos núcleos dos enterócitos e por apresentarem pequeno halo claro de citoplasma ao redor de seu denso núcleo esférico e regular. Para cada fragmento, foram contadas 500 células epiteliais, não incluindo

células caliciformes, segundo a descrição de Ferguson e Murray (1971). O número final de IEL foi expresso em relação a 100 células epiteliais.

4.10. Contagem de células caliciformes

O epitélio intestinal foi examinado em lâminas histológicas coradas com PAS em aumento de 40X em microscópio óptico. As células caliciformes foram identificadas pela sua coloração em tom de rosa escuro. Foi considerado 500µm de superfície do colón e nos vilos no duodeno em cada animal. O resultado foi expresso em quantidade média de células caliciformes por 500µm de superfície do vilo.

4.11. Análise histológica do tecido hepático

Os tecidos do fígado foram fixados em metanol com 20% de DMSO gelado e mantidos a -20°C até o processamento, em seguida o tecido foi desidratado e embebido em parafina. As secções de tecido foram cortados em 4µm de espessura e corados com H.E. para avaliação microscópica.

4.12. Análise histológica do tecido adiposo

O tecido adiposo perigonal foi removido, lavado em solução salina e fixado em formaldeído a 10%. Após 24 h, as amostras de tecido foram transferidas para uma solução de etanol a 70%. As amostras foram então desidratadas e embebidas em parafina, e secções de 7µm do tecido foram coradas com hematoxilina-eosina. As fotografias foram obtidas em microscópio óptico acoplado a uma câmera digital com ampliação 40X.

4.13. Permeabilidade Intestinal

Alíquotas contendo 18,5 Megabecquerel (MBq) de ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio (^{99m}Tc-DTPA) em 0,1 mL de solução foram administradas, por gavagem aos animais. Após 4 horas, os camundongos foram anestesiados, intraperitonealmente, com solução de cloridrato de xilazina (15 mg/kg de peso vivo) e cloridrato de quetamina (80 mg/kg de peso). Em seguida, 300µL de sangue foram coletados por punção axilar para determinação da radioatividade

utilizando contador-gama. Para o cálculo do percentual de dose no sangue, utilizou-se um padrão contendo a mesma dose de ^{99m}Tc -DTPA administrada aos camundongos.

A seguinte fórmula foi utilizada para o cálculo de dose:

Porcentagem (%) da dose de ^{99m}Tc -DTPA no sangue = [(cpm do sangue X 100) / cpm da dose (Padrão) administrada].

Com = contagem por minuto

4.14. Medida de IgA secretória (SIgA)

As fezes foram coletadas no colón dos animais após a eutanásia, pesadas e homogenizadas em PBS a 100mg/mL. As placas de poliestireno de máxima adsorção (NUNC) foram sensibilizadas com 100µl/poço de solução contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos 1mg/mL (Southern Biotechnology), diluídos (1:10000) em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com uma solução de caseína a 0,25% em salina tamponada com fosfato (PBS-caseína) por uma hora à temperatura ambiente (200µl/poço). O sobrenadante das fezes foi diluído 1:80 e adicionado a placa, posteriormente, realizou-se oito diluições seriadas (1:2). As placas foram incubadas durante uma hora a temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram lavadas, cinco vezes com salina-tween. Anticorpos anti-IgA de camundongo conjugados com biotina 0,5mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:10000) em PBS-0,25% caseína foram adicionados aos poços (100µL/poço). As placas foram novamente incubadas por uma hora a 37 °C. Ao término do período, as placas foram lavadas e adicionou-se solução de estreptavidina ligada à peroxidase (Sigma) na diluição 1:10000 (100µl/poço) em PBS-0,25% caseína durante uma hora a temperatura ambiente. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-conjugado foi feita através da incubação com 4mg de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma), 2µL de H₂O₂ diluídos em 10mL de tampão citrato 100µl/poço, A reação foi interrompida pela adição de 20µL/poço de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático (Microplate Reader Model 450, Bio-Rad), em comprimento de onda de 492nm. Essa reação de ELISA acima descrita teve como controle positivo (padrão), anticorpos purificados IgA (10mg/mL) de camundongo (Southern Biotechnology) em uma diluição 1:10 em PBS-0,25% caseína. PBS- 0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.

4.15. Indução da Tolerância Oral

Os animais foram divididos em dois grupos os que receberam dieta AIN93G e HSB durante 13 semanas, e posteriormente em subgrupos sendo eles: *naive*, que não recebeu nenhum tratamento (controle negativo), grupo **salina** que não entrou em contato com o antígeno previamente (controle positivo), grupo **OVA** que recebeu gavagem contendo antígeno (OVA) (Grupo OVA) ou por *continuous feeding* que foi tratado via oral com solução contendo 4mg/ml de ovalbumina por ingestão voluntária durante 24 horas. Como o consumo médio de líquido dos camundongos no nosso biotério é de 5 ml/dia (DA SILVA MENEZES et al, 2003; FARIA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2015) a dose final de OVA consumida por via oral ao final do dia é de aproximadamente 20mg.

4.15.1. Tratamento Grupo Experimental

Utilizou-se como antígeno Ovalbumina (OVA) três vezes cristalizada- Grade III (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), via oral em uma única administração (gavagem) com 10mg de OVA em 0,2mL de soro fisiológico por meio de uma agulha de alimentação de animais inoxidável calibre 18 de ponta redonda. Para o grupo *continuos feeding* administrou o antígeno (na concentração de 2mg/mL) na água por 24 horas. Já no grupo imune foi tratado com apenas 0,2mL salina por gavagem. Sete dias após o tratamento oral foi injetado nos camundongos via intraperitoneal (i.p) 10µg OVA em 1mg de Hidróxido de Alumínio (Al(OH)₃) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) como adjuvante em 0,2mL de salina. Um reforço com 10µg OVA em salina foi administrado via intraperitoneal 14 dias após a sensibilização, e 7 dias seguidos do reforço os animais foram eutanasiados (Figura 3).

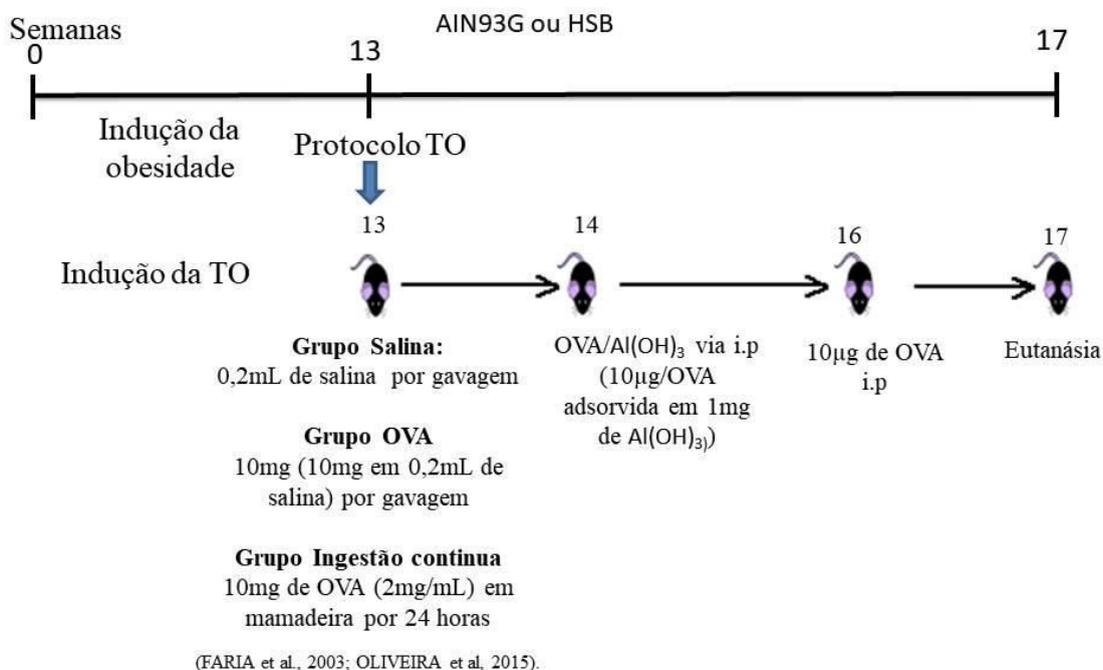


Figura 3: Delineamento experimental para o estabelecimento de tolerância oral.

Al(OH)₃- hidróxido de alumínio; i.p. - intraperitoneal; OVA - ovalbumina; TO -Tolerância Oral.

4.16. Obtenção do Soro

Para obtenção do soro, os animais foram anestesiados utilizando 100µl de solução de Cloridrato de Quetamina (1,7mg/kg) e Xilazina (0,33mg/kg). Em seguida, o sangue foi coletado por meio de uma incisão no coração e centrifugados a 300g por 10minutos. Após a coagulação do sangue, o soro foi separado, coletado e armazenado a 20°C para posteriores análises.

4.17. Ensaio Imunoenzimático para Medida de Anticorpos Anti-OVA

Para determinar a concentração de anticorpos específicos anti-OVA presentes no soro dos camundongos foi utilizado o método ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*). Microplacas de poliestireno de 96 poços (NUNC) foram sensibilizadas com 100µl de uma solução de OVA (20µg/ml) diluída em tampão de carbonato pH9,6, logo as placas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C. Após o período de incubação as microplacas foram lavadas três vezes com salina-tween (salina contendo 0,05% Tween-20 – SIGMA Chemical Co), bloqueadas com 200µl PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura

ambiente. Ao termino da incubação, as placas foram lavadas novamente três vezes em salina-tween e incubadas por uma hora a 37°C com soro dos camundongos em diluição seriada de 1:500 a 1:36000 em PBS-caseína. Como controle negativo foi utilizado soro de animais naive. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com salina-tween e incubadas com 100µl de uma solução de anticorpo de *goat anti-mouse* IgG1 ou Ig Total de camundongo conjugado à peroxidase (Southern Biotechnology Ass, Inc.) na diluição de 1:10000 por uma hora à 37°C. Ao termino do período indicado às placas foram lavadas seis vezes com salina-tween. A reação enzimática foi revelada incubando-se as placas, abrigo da luz, com 100µl de uma solução contendo 0,2µl/ml de H₂O₂ e 0,4mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após termino dessa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância ($\lambda = 490\text{nm}$) de cada poço obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

4.18. Obtenção células de órgãos linfoides

O baço e os linfonodos mesentéricos de cada animal foram retirados sob o fluxo laminar estéril e mantidos em meio de cultura RPMI (HYCLONE – Logan, Utah, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab – Campinas, SP, BR), 2mM de L-glutamina (GIBCOBRL – Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA), 25mM de HEPES (SIGMA – St. Louis, MO, EUA), 50µM de 2-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech – Uppsala, Suíça) e 20 µg/mL de sulfato de gentamicina (Schering-Plough – Rio de Janeiro) em ambiente estéril até o plaqueamento das células. Os baços foram homogeneizados em um homogeneizador de tecido manual de vidro estéril. Os linfonodos foram homogeneizados com lâminas de vidro de extremidades foscas estéreis friccionando-as uma a outra, em 2ml de meio completo em cima de uma placa de Petri. O homogeneizado de células foi centrifugado durante dez minutos a 300g, a 4°C em tubos cônicos de 15mL. O sobrenadante foi descartado e o infranadante reconstituído em 500µl de meio completo para os linfonodos mesentéricos. Para a hemólise do baço acrescentou-se 9ml de água estéril e em seguida de 1ml de PBS 10 vezes concentrado, posteriormente a solução foi centrifugada por 10 minutos a 300g, a 4°C, desprezou o sobrenadante e ressuspendeu o infranadante em 1mL de meio completo.

4.19. Cultura de Células

As células foram plaqueadas (5×10^6 células/mL) em placas de 96 poços e incubadas por 48 e 72 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Estas foram estimuladas com OVA (100µg/mL) ou mitógeno Concanavalina A (10µg/ml) (controle positivo). Ao término do período de incubação o sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise de citocinas.

4.20. Obtenção de suspensão de células do tecido adiposo

O tecido adiposo epididimal foi retirado e pesado aproximadamente 500mg por animal. Posteriormente fragmentou o tecido em pedaços menores com auxílio de uma tesoura e em seguida adicionou RPMI com colagenase II Sigma (C6885) 2,5mg/ml e DNase I Sigma (DN25) 150µg/mL e manteve o tecido sob agitação em um homogeneizador orbital a 37°C por 1 hora. Ao término do período colocou o recipiente com o tecido no gelo para interromper a reação da colagenase e filtrou a solução com filtros de nylon (Cell Strainer, BD) de 70µm e adicionou RPMI com 2% SFB até completar 10mL em tubos cônicos de 15mL. A solução foi centrifugada a 300g por 10min a 4°C e apenas os leucócitos foram coletados com auxílio de uma pipeta tipo *Pasteur* de vidro. Adicionou-se na suspensão de células meio RPMI com 2% SFB até completar 10mL. A solução foi centrifugada novamente a 300g por 10min à 4°C e ao término do processo desprezou o sobrenadante e ressuspendeu as células com 1mL de meio RPMI com 2% de SFB.

4.21. Citometria de Fluxo

4.21.1. Imunofenotipagem

Após a homogeneização das células dos órgãos de interesse, uma suspensão com 2×10^7 células/mL foi filtrada em filtro de 40µm. As células foram incubadas em por 10min com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc block, BD Pharmingen) e então por mais 30 minutos a 4°C com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos reativos para as moléculas de superfície de interesse. Foram utilizados os seguintes marcadores: CD4 (APC), CD45.2 (APC Cy7), CD44 (Pe-Cy7), LAP (Pe) e L/D (AmCyan) para avaliar

células T reguladoras e ativadas nos LNMs e do tecido adiposo. Para avaliar as APCs nos LNMs foram utilizados os seguintes marcadores CD103 (FITC), CD11b (PePcy5.5), CD11c (APC), F4/80 (Pecy7), CD45.2 (APC e-fluor 780) e MHCII (Pacific Blue). Para obtenção de controle positivo e negativo foram realizadas a marcação de células simples, leitura de apenas células as quais não possuía marcadores e método de controle de Fluorescência Menos Um (FMO).

Ao término da marcação as placas foram encubadas a 4°C por 30 a 40 minutos e posteriormente foram lavadas adicionando-se 200µl de PBS com 2% de SFB e centrifugando-se a 4°C por 10 minutos a 300g, este procedimento foi realizado duas vezes. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante, e as células foram recompostas em 150µl de PBS com 2% SFB.

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro FACScanto, acoplado a um computador com o software Diva. A partir de um gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células pelo padrão de dispersão do laser após a passagem das mesmas (*Forward Scatter x Side Scatter*), foram delimitadas as populações de interesse e, a partir destas, foram gravados 100 mil eventos para análise de linfócitos e das APCs. Análises posteriores foram feitas utilizando o software FlowJo para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação além do nível de expressão das respectivas moléculas. As estratégias para determinação da população de células apresentadoras de antígeno de interesse estão exemplificadas na Figuras 4 e 5.

4.21.2. Estratégias de Determinação das Populações de Interesse

As células extraídas linfonodos mesentéricos e tecido adiposo foram avaliadas por citometria de fluxo com o objetivo de identificar os linfócitos TCD4, células dendríticas e Tregs. A identificação foi feita através da seleção por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (*gate* para linfócitos ou granulócitos) e posterior separação de populações negativas ou positivas para os marcadores utilizados (Figura 04).

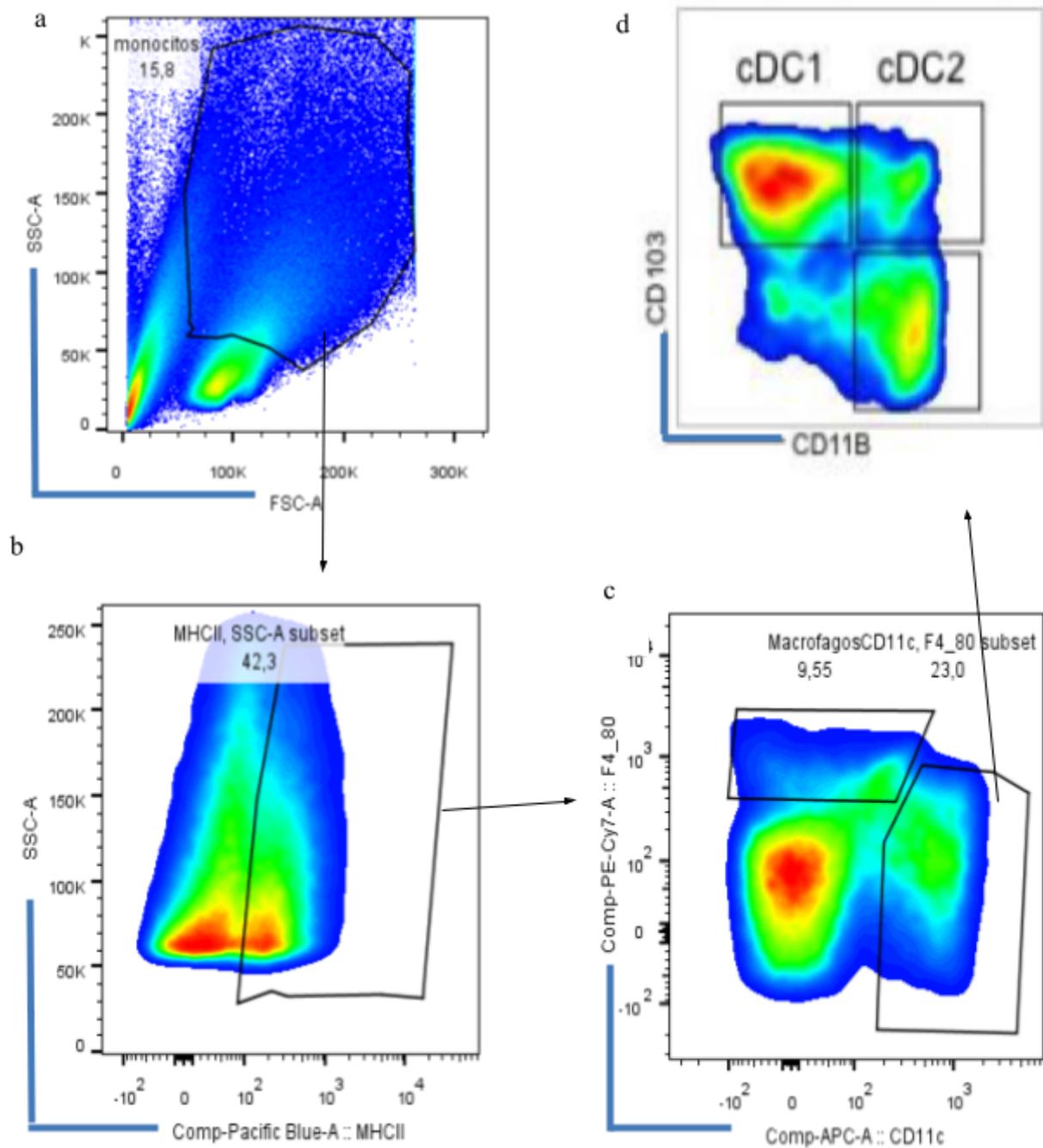


Figura 04 - Imunofenotipagem de células dendríticas dos LNMs.

(Fig. 4a) Os granulócitos foram identificados pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (*gate* para granulócitos). (Fig. 4b e 4c) A suspensão celular foi marcada com anticorpos específicos. As células negativas para marcadores de linfócitos MHCII⁺, CD11c⁺ e F4/80⁻ foram segregadas. (Fig. 4d) As populações de células dendríticas foram analisadas de acordo com a expressão de CD103 e CD11b. Os *dot plots* representam a estratégia de análise utilizada.

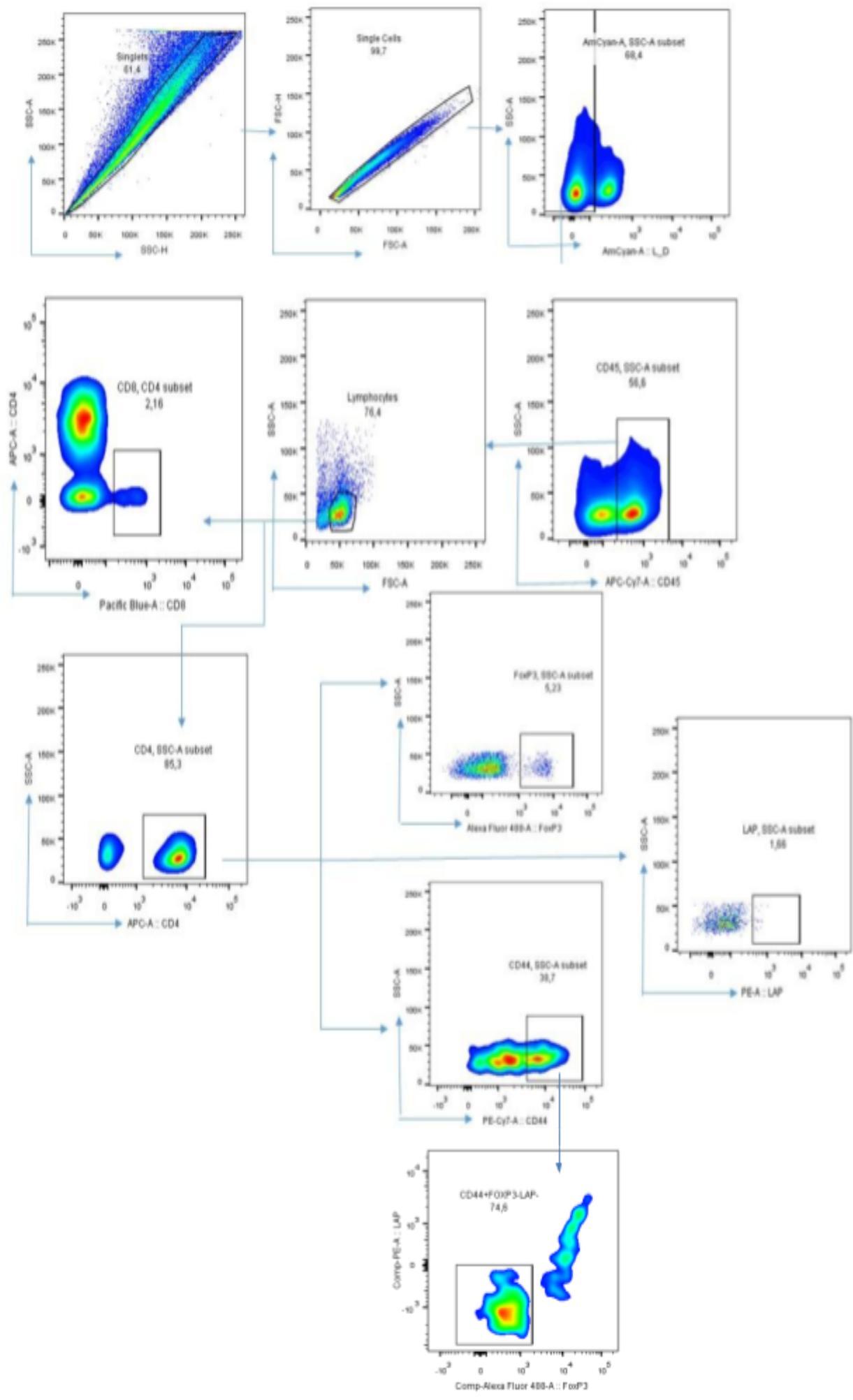


Figura 05 - Imunofenotipagem de células TCD4⁺ reguladoras e ativadas nos LNMs e tecido adiposo. As células em suspensão foram marcadas com anticorpos específicos e avaliadas por citometria de fluxo. Foram selecionadas as células viáveis e retirados os doublets selecionando-os pelos parâmetros SSC-A e FSC-A. Os linfócitos T foram identificadas através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (gate para linfócitos) e posterior separação pela expressão de CD8 e CD4 (Foxp3⁺, CD44⁺ e LAP⁺). Os dot plots representam a estratégia utilizada.

4.22. Ensaio Imunoenzimático para medida de citocinas

Microplacas de poliestireno de alta adsorção de 96 poços (NUNC) foram sensibilizadas com 100µl de uma solução de anticorpos monoclonais purificados reativos com as citocinas IL-10, IFN-γ e TGF-β (R&D-Systems® ELISAs, Minneapolis, MN Toll Free/USA) e a placa foi incubada a temperatura ambiente por uma noite. Após a incubação as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,5% de tween e bloqueadas com de solução de albumina bovina 1% em tampão fosfato por duas horas (1% de BSA em PBS). As placas foram lavadas novamente por três vezes e 100µl de sobrenadantes foram adicionados aos poços, o padrão com concentração conhecida foi adicionado para realizar diluição seriada, quatro poços foram deixados com a solução de reagente diluente para que fosse o branco (controle negativo) e as placas foram incubados por duas horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente por cinco vezes e anticorpos monoclonais biotinilados reativos com as citocinas foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas por duas hora à temperatura ambiente. Foi adicionada estreptavidina marcada com peroxidase (HRP) a 1:40 e as placas foram incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação de cor foi desenvolvida à temperatura ambiente com 100µl/poço de ortofenilenodiamina (1mg/ml), 0,04% de substrato H₂O₂ em tampão citrato de sódio. A reação foi interrompida pela adição de 20µl/poço de H₂SO₄ 2N. A absorbância foi medida a 492nm em um leitor de ELISA (BIO-RAD Modelo 450).

4.23. Análise Estatística

Para avaliar a diferença estatística entre as variáveis, utilizou-se o teste t de Student e ANOVA para as amostras não pareadas e pareadas aceitando-se o nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

O consumo da dieta HSB induziu o ganho peso nos camundongos, que apresentou diferença significativa a partir da quinta semana de oferta da dieta quando comparado ao grupo que recebeu AIN93G (Fig.6a). Em adição aos valores obtidos das análises de peso corporal foi considerado como indicador de obesidade em camundongos o índice de adiposidade, que ao final de treze semanas de alimentação com dieta HSB estes animais apresentaram um acúmulo substancial de tecido adiposo epididimal quando comparados ao controle AIN93G (Fig.6b). O aumento da adiposidade também pode ser observado pela análise histológica. Como mostrado na Figura 6c, os adipócitos de camundongos alimentados com HSB apresentaram hipertrofia (aumento do tamanho) e o tecido adiposo apresentou maior quantidade de infiltrado celular.

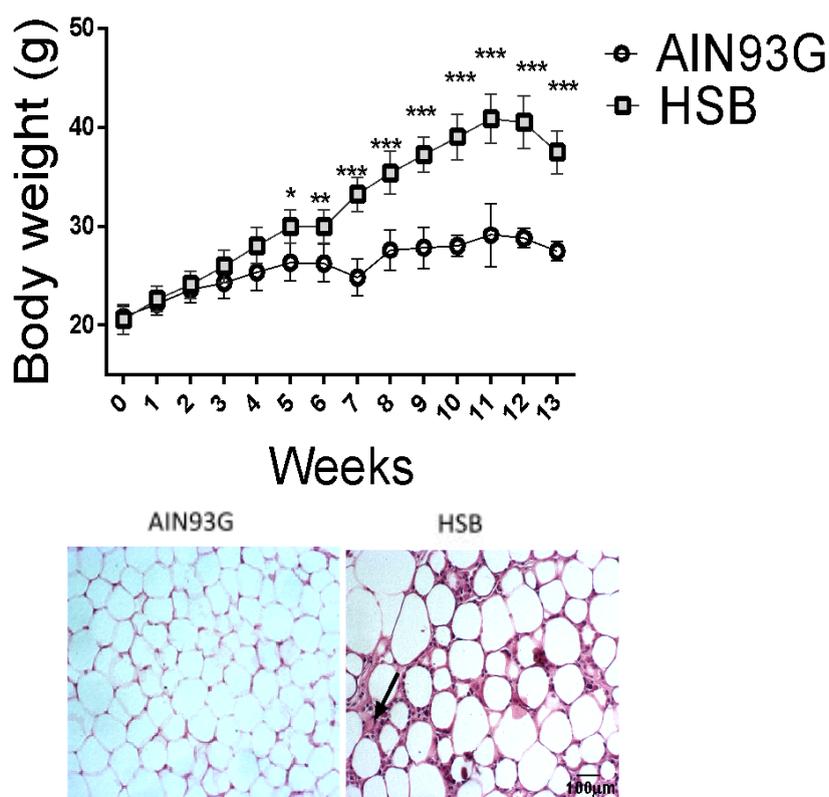


Figura 6: O consumo de dieta HSB induz ganho de peso e hipertrofia do tecido adiposo. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta controle AIN93G ou dieta HSB por 13 semanas. Durante esse período, o ganho de peso corporal foi monitorado (a). Ao final desse período, os animais foram sacrificados e o tecido adiposo perigonadal foi isolado para avaliação do índice de adiposidade, expresso pelo peso do tecido adiposo perigonadal/peso corporal (b) e para análise

histológica (c). O painel c à esquerda representa o tecido adiposo perigonadal de camundongos tratados com dieta AIN93G (esquerda) e o painel à direita de animais tratados com a dieta HSB. A seta indica o infiltrado celular do tecido adiposo dos animais obesos. A análise do tamanho dos adipócitos foi realizada utilizando barra de escala de 100 μ m. Barras representam valores (média \pm DP) de um grupo (n = 10) representa a diferença entre os grupos *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Somado ao ganho de peso corporal e adiposidade, avaliou-se a ingestão dietética e as alterações metabólicas resultantes do consumo da dieta HSB. Apesar do consumo dietético avaliado em gramas/dia não apresentar diferença entre os grupos, ao considerar a média do valor calórico total consumido diariamente observou que os animais tratados com a dieta HSB ingeriram mais calorias (Fig. 7a,b).

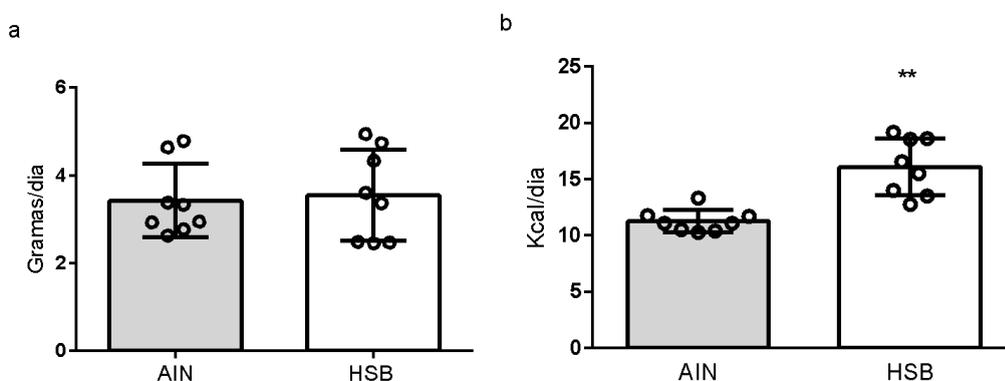


Figura 07: Consumo dietético avaliado em Kcal foi maior no grupo tratado com dieta HSB.

Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta controle AIN93G ou dieta HSB por 13 semanas. A média do consumo dietético em gramas (a) e o valor calórico (Kcal) ingerido diariamente (b) pelos animais que consumiram dieta AIN93G ou HSB foram monitorados ao longo desse período. (*) representa a diferença entre os grupos *p<0,05 **p<0,01. N=8

Em adição, os camundongos alimentados com HSB apresentaram níveis de glicemia de jejum a partir da quinta semana de oferta da dieta HSB comparáveis ao encontrado em animais diabéticos (>250mg/dL) (Fig. 8a), e quando submetidos ao teste de tolerância oral a glicose (GTT) também demonstraram menor tolerância a glicose (Fig. 8b,c). Outros parâmetros metabólicos como perfil lipídico sérico (triglicerídeos e colesterol total) e esteatose hepática (mais de 60% dos hepatócitos contendo gotículas de lipídeo) estão alterados nos animais que receberam dieta HSB quando comparado aos camundongos alimentados com a dieta padrão AIN93G (Fig. 8 d-f).

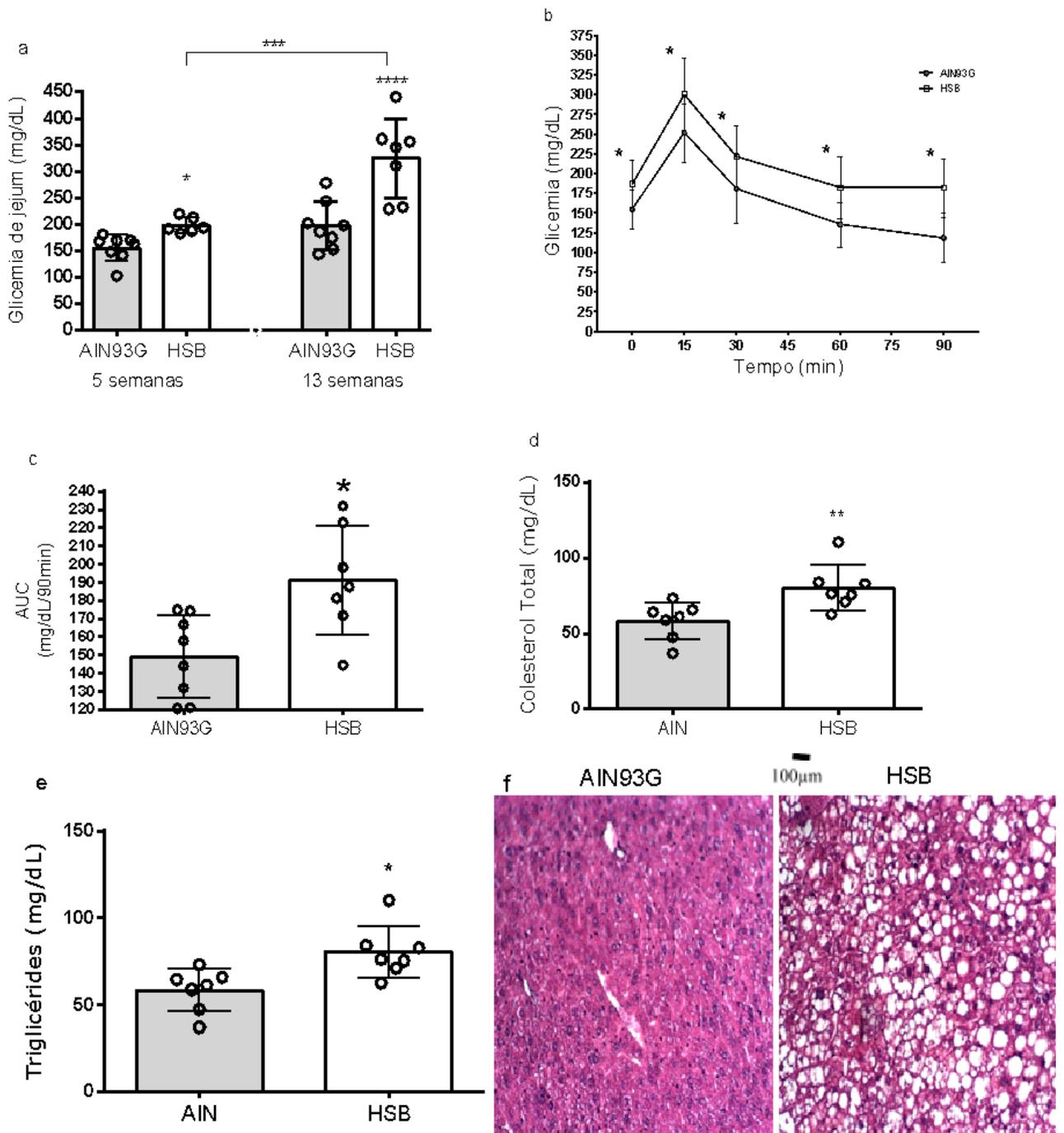


Figura 8: **O consumo da dieta HSB causou hiperglicemia e dislipidemia em camundongos.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta controle AIN93G ou dieta HSB por 13 semanas. Foram avaliados os níveis de glicemia de jejum (a) na quinta e na décima terceira semana de tratamento e realizado o teste de tolerância oral a glicose (b). Área sob a curva (AUC) de concentração glicêmica em função do tempo durante o teste de tolerância à glicose (c) Os níveis séricos de triglicerídeos (d) e colesterol total (e) séricos foram avaliados por ensaio enzimático na décima terceira semana de tratamento com dieta AIN93G ou HSB. Após 13 de semanas de consumo das dietas, os animais

foram sacrificados e os fígados dos camundongos que consumiram a dieta AIN93G (esquerda) ou HSB (direita) foram retirados para avaliação histológica (f). Barras representam valores (média \pm DP) de um grupo (n = 10). (*) representa a diferença entre os grupos * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. N=7

Considerando a importância dos componentes da mucosa intestinal para o estabelecimento da tolerância oral, avaliamos a arquitetura do intestino por meio da análise das alturas das vilosidades, o número de linfócitos intraepiteliais (IELs) e de células caliciformes no duodeno, principal segmento do intestino envolvido na indução da TO (ESTERHÁZY *et al.*, 2018). Além do duodeno, analisamos também a frequência de células caliciformes no cólon, região da mucosa intestinal onde essas células são mais abundantes. A disbiose intestinal e a alteração da frequência dessas células podem resultar em modificações da resposta imune a bactérias e aos antígenos da dieta (LUCK, 2015). A altura das vilosidades intestinais não apresentou diferença entre os grupos (Fig.9b). O número de IELs e de células caliciformes estava aumentado no duodeno dos animais obesos (Fig.9c,d), já a frequência de células caliciformes no cólon não apresentou diferença entre os grupos (Fig. 10). Os IELs são importantes para a manutenção da homeostase intestinal e manutenção da função da barreira epitelial intestinal. Essas células regulam a resposta imune inata e adaptativa e o número delas está aumentado durante episódios de infecção e inflamação intestinal, (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2010). Tem sido demonstrado, em modelos de alergia alimentar, que os linfócitos intraepiteliais expressando TCR $\gamma\delta$ são de extrema importância para o estabelecimento da tolerância a proteínas da dieta (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2010; FROSSARD *et al.*, 2015).

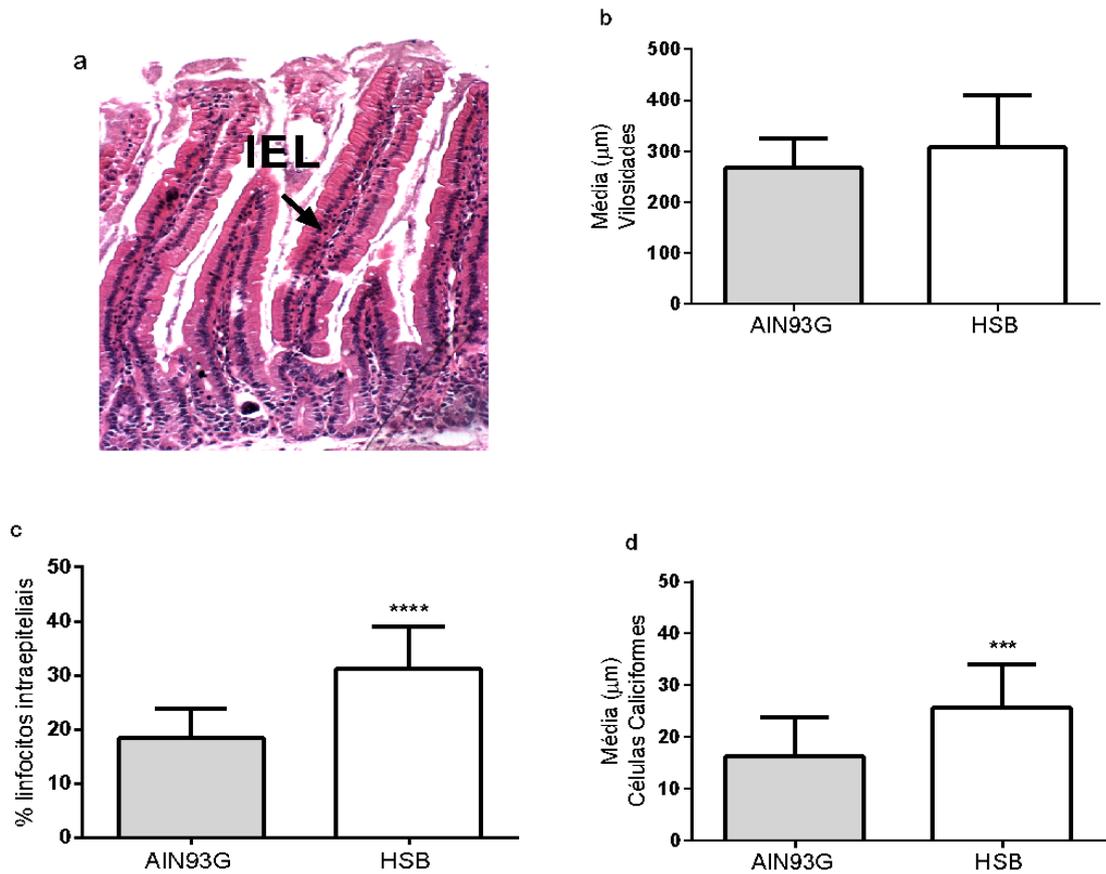


Figura 9: Frequências de linfócitos intraepiteliais e células caliciformes estão aumentadas no duodeno de camundongos tratados com dieta HSB. (a) Imagem histológica do duodeno representando a localização de células caliciformes e IELs. (b) Análise morfométrica dos vilos de camundongos tratados por 13 semanas com dieta AIN93G ou HSB. Foram selecionadas 5 vilosidades por secção histológica em 10 secções diferentes, sendo no total 50 vilosidades por animal, resultados expressos pela média \pm desvio padrão (n=10). (c) Frequência de linfócitos intraepiteliais no duodeno de camundongos tratados com dieta AIN93G ou HSB. A O número foi definido pela contagem de IELs entre os enterócitos do duodeno de camundongos considerando um intervalo de 500 enterócitos (n=10 animais por grupo). Contagem feita no aumento de 20x coloração HE. (d) Representação gráfica da análise de pixels representando a área celular em lâminas histológicas de células caliciformes. Para o estabelecimento desse valor, foram consideradas as medidas de todas as células coradas em 6 campos aleatórios por animal com aumento de 10x (n= 10 animais por grupo) As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. (*) representa a diferença entre os grupos *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

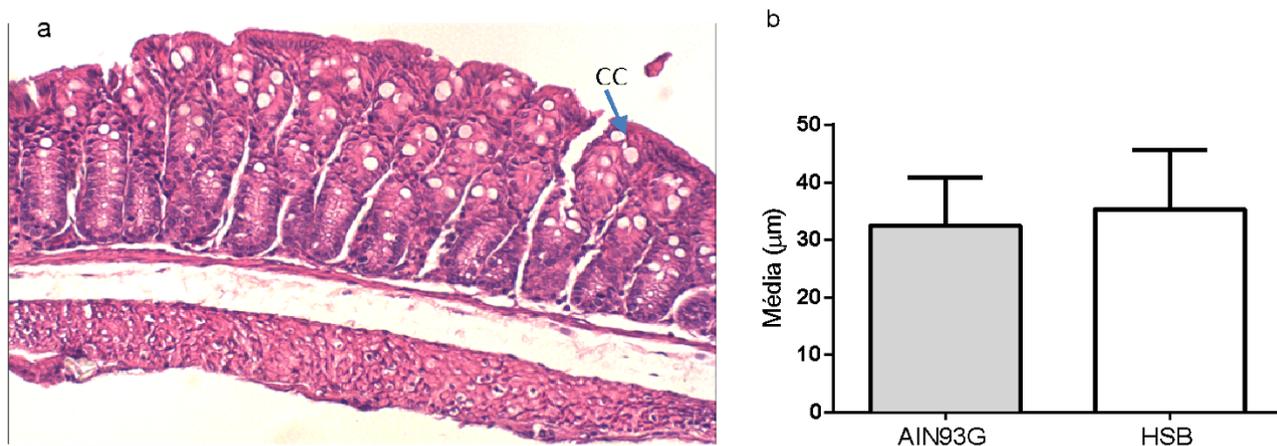


Figura 10: A frequência de células caliciformes no cólon de camundongos tratados com dieta AIN93G ou HSB não foi diferente. (a) Imagem histológica do cólon representando a localização de células caliciformes. (b) Representação gráfica da análise de pixels representando a área celular em lâminas histológicas de células caliciformes. Para o estabelecer esse valor, foram consideradas as medidas de todas as células coradas em 6 campos aleatórios por animal com aumento de 10x (n= 10 animais por grupo). As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo.

Somadas as alterações metabólicas associadas a obesidade induzida por dieta e da frequência de células envolvidas na integridade da barreira intestinal, resolvemos investigar o comprometimento da barreira intestinal, que pode levar ao aumento da inflamação crônica de baixa intensidade presente no obeso, aumento da permeabilidade de endotoxinas e da resistência à insulina (CANI et al., 2007). Nesse cenário, foi possível observar que a ingestão da dieta HSB piorou a função da barreira intestinal aumentando sua permeabilidade (Fig. 11).

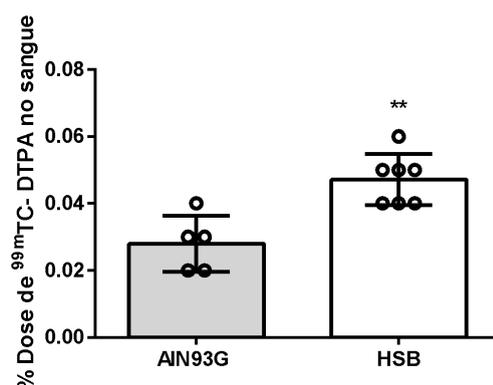


Figura 11: A obesidade induzida por dieta aumentou a permeabilidade intestinal em camundongos. Concentração plasmática de ^{99m}Tc -DTPA em camundongos tratados por 13 semanas com dieta AIN93G ou HSB, após a gavagem oral como medida de permeabilidade intestinal. Barras representam valores (média \pm DP) de um grupo (n=5 para AIN93G e n=7 para HSB). Os dados são representativos de três experiências individuais. (*) representa a diferença entre os grupos $**p < 0,01$.

Diante do aumento da permeabilidade intestinal, investigamos também se haveria também alterações nos níveis de imunoglobulina A secretória (SIgA) presente no lúmen intestinal que pode contribuir para os mecanismos de manutenção da barreira e de homeostase da mucosa intestinal. A produção de IgA secretória (SIgA) depende principalmente da presença da microbiota (BRANDTZAEG; JOHANSEN, 2005) e do receptor Ig polimérico (pIgR; que é necessário para o transporte de IgA da LP para o lúmen) presente nas células epiteliais (EDITORIAL et al., 2011). Uma vez secretada, a IgA torna-se parte da matriz de muco e atua como um anticorpo neutralizante que se liga a toxinas e receptores de adesão de microrganismos presentes no lúmen. (FERGUSON; MURRAY, 1972; PABST, 2012). Porém, o contato antigênico ou com bactérias da mucosa pode levar a uma resposta imune local com produção de IgA secretória aumentada (WEINER et al., 2011). Não há consenso na literatura sobre o aumento ou a redução da IgAs em animais com obesidade induzida por dieta. No nosso estudo, encontramos um aumento na produção de SIgA em animais alimentados por dieta HSB (Fig. 12).

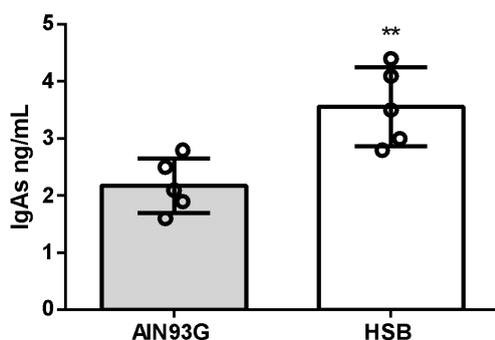


Figura 12: Aumento da concentração de IgA secretória em animais obesos. Concentrações séricas de IgAs em camundongos C57BL/6 tratados com dieta AIN93G ou HSB. Resultados expressos com método de ELISA. Cada símbolo indica um animal individualmente. $**p < 0,01$ (teste t bicaudal).

Outro local importante para manutenção da homeostase intestinal e estabelecimento da imunidade adaptativa às perturbações luminiais, incluindo geração periférica eficiente de células T efetoras e de células Tregs, são os LNs. Assim, resolvemos investigar se a obesidade induzida por dieta poderia resultar em alterações na frequência e tipo das APCs nesse órgão. A linhagem de macrófagos foi identificada utilizando os seguintes marcadores MHCII⁺CD11c⁺F4/80⁺ e a linhagem comum de DCs identificada como MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺CD11b⁺, MHCII⁺CD11c⁺CD103⁻CD11b⁺ e MHCII⁺CD11c⁺CD103⁺CD11b⁻.

Coombes e colaboradores, 2007 (COOMBES et al., 2007b), mostraram que as DCs principalmente as CD103⁺ em camundongos são responsáveis pela captação de antígeno administrado oralmente e promovem a geração de células Treg, por esta razão são consideradas tolerogênicas e as principais impulsionadoras da tolerância no intestino (MURRAY; WYNN, 2011; COOMBES et al., 2007a). A maioria das DCs do intestino delgado são CD103⁺CD11b⁺. Em animais com obesidade induzida por dieta as células CD103⁺CD11b⁺ estão reduzidas quando comparadas aos animais magros (Fig. 13a). Somados a este resultado a população de DCs CD103⁻CD11b⁺, também apresentam-se reduzida nos animais obesos (Fig. 13b). Outro subconjunto de DCs tem mostrado envolvidas na indução de células Tregs FOXP3⁺ *in vitro* via metabolização de AR são as CD103⁺CD11b⁻ e é também o único subconjunto de DCs da mucosa que pode ativar o TGF-β via expressão da integrina αvβ8 (COOMBES et al., 2007a), no entanto, essa população não apresentou diferença entre os grupos avaliados (Fig. 13c). Nos animais obesos identificou-se também uma redução da frequência de macrófagos (Fig. 13d) no LNs, no entanto, não investi o perfil destes.

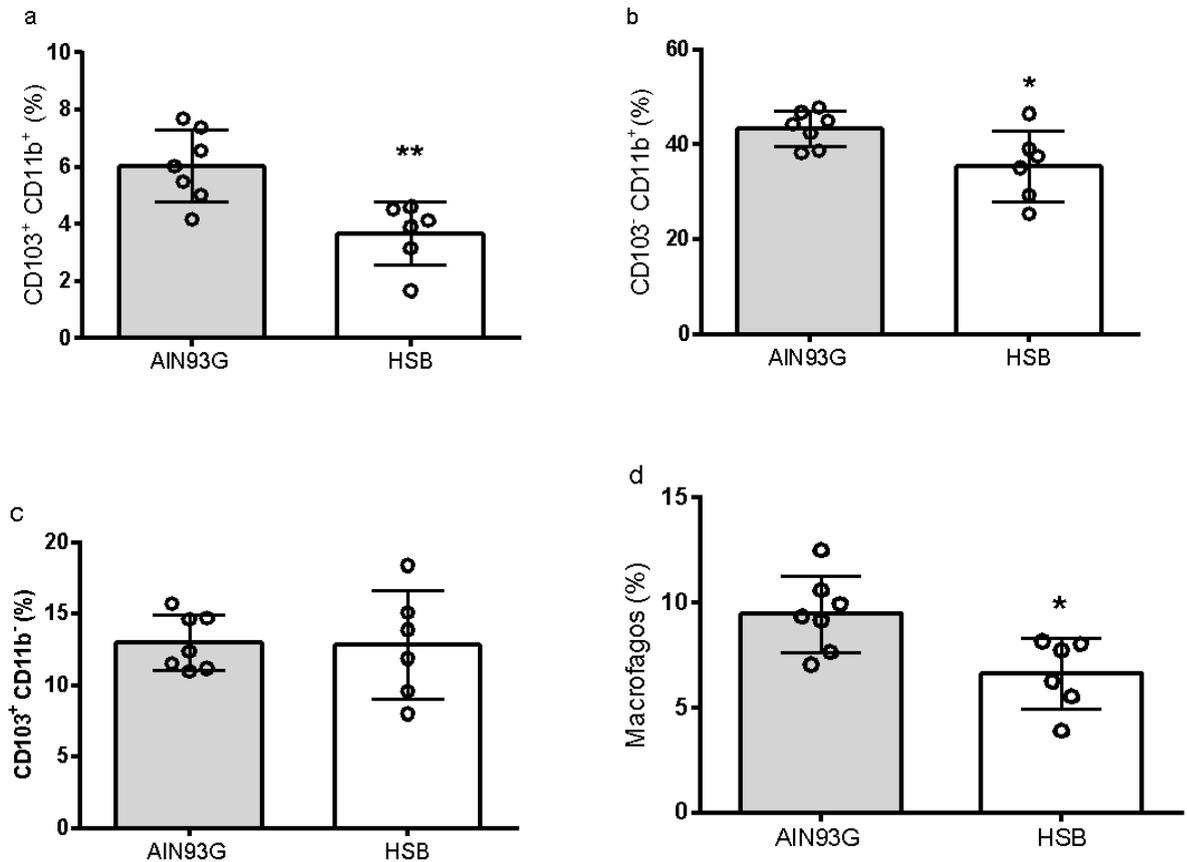


Figura 13: As frequências de macrófagos e de subpopulações de DCs estão reduzidas em camundongos com obesidade induzida por dieta nos LNMs. Os resultados representam a frequência de macrófagos e DCs suspensão celular e representação por citometria de fluxo. Resultados expressos por frequência \pm desvio padrão. Cada símbolo indica um animal individualmente. * $P < 0,01$ (teste t bicaudal). $N=6$

Diante de das alterações na mucosa intestinal associadas a obesidade decidimos avaliar se estas modificações poderiam interferir na resposta imune aos antígenos da dieta. Assim, camundongos C57BL/6 machos que receberam dieta AIN93G ou HSB durante 13 semanas foram tratados por gavagem com 10mg de OVA ou salina. Após 7 dias, esses animais foram imunizados com 10 μ g OVA em 1mg de Al(OH)₃, e após 14 dias receberam um reforço com 10 μ g de OVA. A eutanásia foi realizada 7 dias após o reforço para análise de anticorpos séricos específicos para OVA. De acordo com a Figura 14a, os animais alimentados com dieta AIN93G desenvolveram tolerância ao antígeno OVA administrado por gavagem, observado tanto pela redução dos níveis de Ig totais anti-OVA, como pelos níveis de IgG1-anti OVA. No entanto, os animais alimentados com dieta HSB a tolerância não pôde ser observada (Fig. 14b).

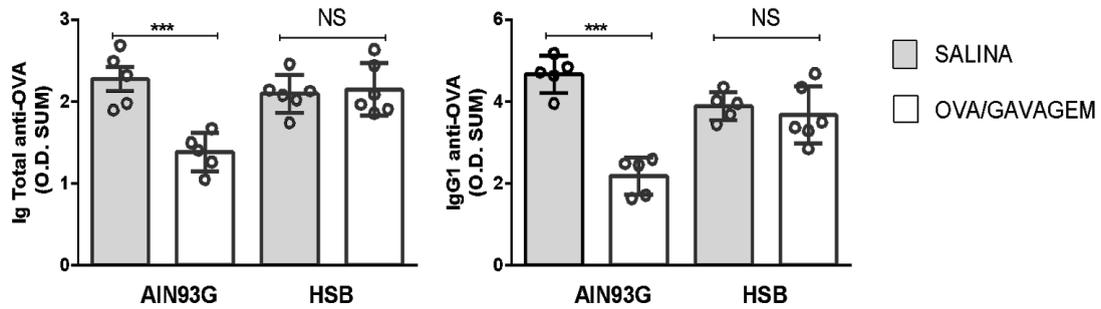


Figura 14: Camundongos obesos não desenvolveram tolerância oral ao antígeno administrado por gavagem. (a) Presença de Ig total anti-OVA e (b) IgG1 anti-OVA em soros de animais C57BL/6 tratados com OVA ou salina via oral (gavagem). Os resultados estão expressos como média aritmética \pm desvio da soma das OD das diluições seriadas (O.D. SUM). Cada símbolo indica um animal individualmente. NS, não significativo *** $P < 0,005$ (teste t bicaudal). $N=5$

Para avaliar a resposta celular, foi realizada cultura de células do baço e dos LNMs, e a produção de citocinas pelas células foi medida por ELISA. Assim, medimos a produção de citocinas relacionadas com o estado tolerogênico TGF- β e a IL-10 e citocina com perfil pró-inflamatório como IFN- γ que após a indução da TO apresentasse reduzida (CASTRO-JUNIOR et al., 2012). Observamos que as células de baço dos animais que consumiram a dieta AIN93G e ficaram tolerantes produziram mais TGF- β do que animais imunes (Fig. 15a) e menos IL-10 e IFN- γ (Fig.15b,c). Já as células do baço dos animais obesos, que consumiram a dieta HSB, não apresentaram diferença na produção de TGF- β e IL-10, porém produziram mais IFN- γ quando obtiveram contato prévio com ao antígeno.

Ao avaliar a produção de citocinas por células dos LNMs, não identificamos diferenças na produção de IL-10. Porém, as células dos animais obesos que receberam OVA tiveram maior produção de IFN- γ quando comparados com os que receberam salina (Figura 16a,b).

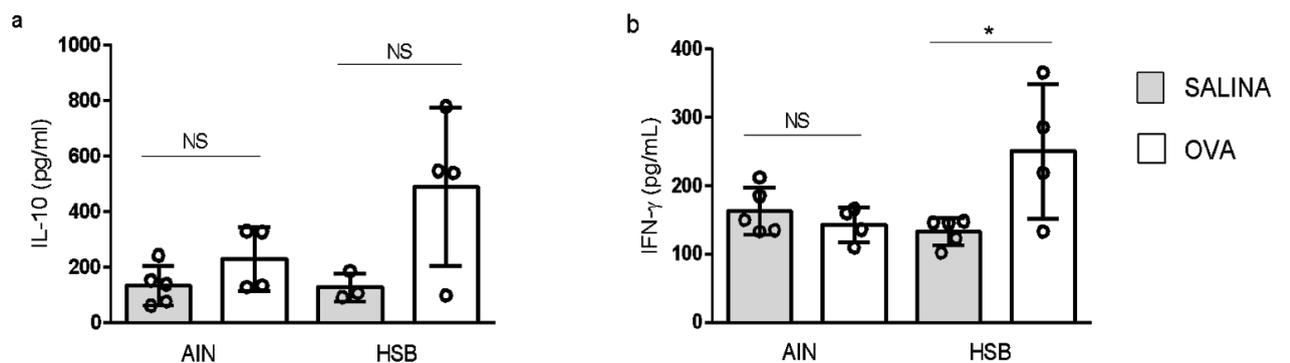
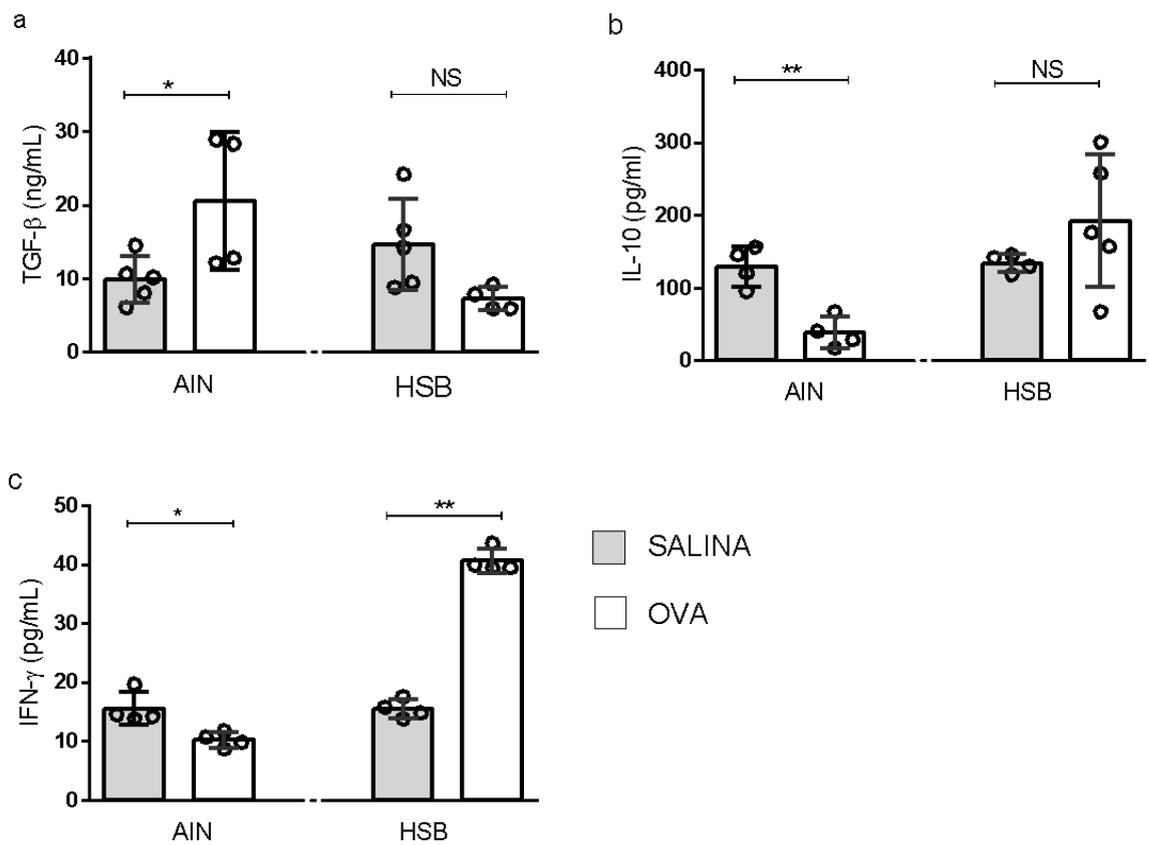


Figura 16: Produção de citocinas pelos LNMs de camundongos tratados com OVA por gavagem. Camundongos machos, alimentados com dieta AIN93G ou HSB, tratados oralmente com 10mg de OVA (gavagem) ou salina. As suspensões de células obtidas foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida das citocinas por meio de ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante de células estimuladas com OVA. Resultados expressos como média aritmética \pm desvio padrão da absorbância. Cada símbolo indica um animal individualmente. NS, não significativo * P < 0,01 (teste t bicaudal). N=4.

Vários fatores afetam a indução da tolerância oral, incluindo a idade e estado imune do animal, dose e estrutura do antígeno e a forma de ingestão do antígeno (FARIA et al., 1993; WEINER, 2001). Alguns aspectos que afetam o indivíduo podem os tornar menos suscetíveis à intervenção. Assim, considerando que trabalhos posteriores realizados pelo nosso grupo que não apenas frequência, mas também a forma de administração do antígeno se mostrou relevante para a indução da TO, e que a forma de ingestão contínua é mais eficiente para o desenvolvimento da tolerância (OLIVEIRA et al., 2015; FARIA et al., 1993; MELAMED et al., 2018), resolvemos administrar o antígeno OVA de forma contínua. Assim, identificamos que os animais obesos também desenvolveram TO quando comparados aos animais controles, quando receberam OVA por ingestão contínua (Fig. 17).

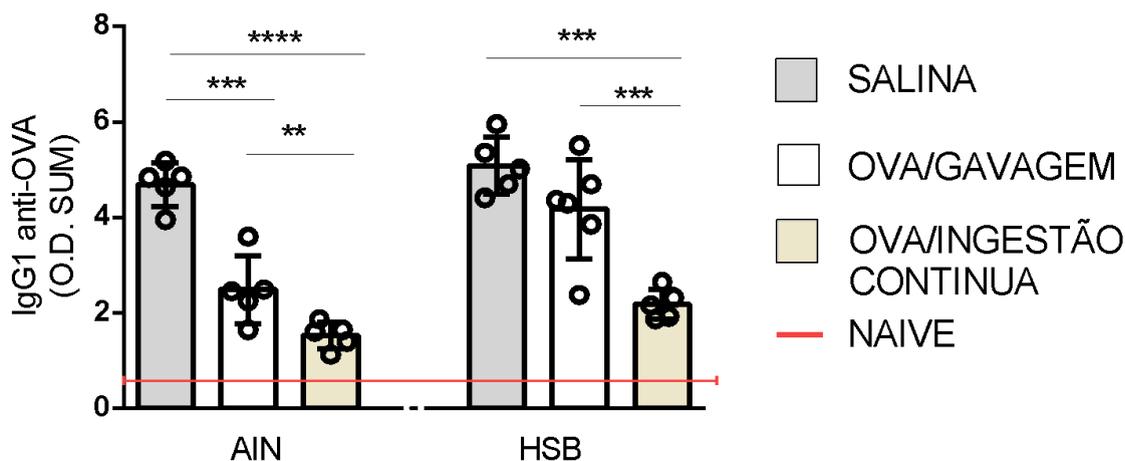


Figura 17: Camundongos com obesidade induzida por dieta tornam-se tolerantes quando a OVA é administrada por ingestão contínua. Concentrações séricas de IgG1 anti-OVA em animais C57BL/6 tratados com OVA por ingestão contínua ou por uma única dose (gavagem) via oral ou somente com salina por via oral 7 dias antes da imunização i.p. com 10 μ g de OVA adsorvida em 1 mg de Al(OH)₃. Os animais foram sacrificados 7 dias após a imunização secundária com 10 μ g de

OVA solúvel e os anticorpos IgG1 foram medidos no soro por ELISA. Resultados expressos como média aritmética \pm desvio da somatória da absorbância das diluições seriadas (O.D. SUM). Cada símbolo indica um animal individualmente. NS, não significativo ($P > 0,05$); * $P < 0,01$ e **** $P < 0,001$ (ANOVA). N=5

Posteriormente, avaliamos se haveria diferença na geração de células Tregs nos LNMs e no tecido adiposo, para identificar se a redução de DCs tolerogênicas encontrada anteriormente nos LNMs influenciaria na diferenciação em células Tregs após a indução de TO nos camundongos com obesidade induzida por dieta.

Nos LNMs, não foi observada diferença significativa na frequência de células efetoras $CD4^+CD44^+Foxp3^+LAP^-$ entre os camundongos controles e obesos (Fig.18a). No entanto, quanto analisamos a frequência de células $CD4^+Foxp3^+$, os animais que consumiram a dieta AIN93G apresentaram aumento de células reguladores, tanto nos após receberem OVA por gavagem, quanto após receberem OVA de forma contínua, já que nos dois casos houve desenvolvimento de TO. Já os animais obesos, apenas os que receberam OVA por administração contínua tiveram aumento da frequência de células $CD4^+Foxp3^+$ e $CD4^+LAP^+$ nos LNMs (Fig. 18b,c).

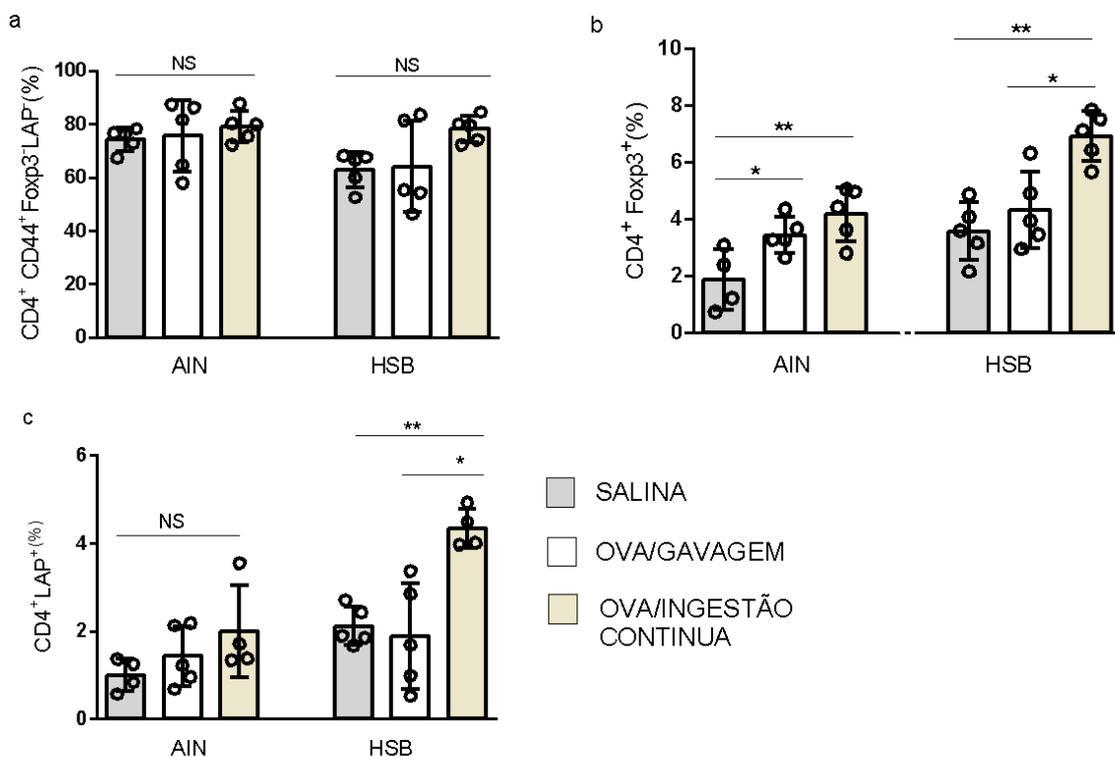


Figura 18: A ingestão contínua de OVA favorece o aumento da frequência de células reguladoras nos LNMs tanto em camundongos normais, quanto nos obesos. Frequência de células efetoras (a) TCD4⁺CD44⁺Foxp3⁻LAP⁻, (b) TCD4⁺Foxp3⁺ e (c) TCD4⁺LAP⁺ isoladas dos LNMs foram analisadas por citometria de fluxo. Todos os *gates* foram definidos a partir das células TCD4⁺ e a frequência foi calculada usando o software FlowJo. As barras representam a média ± SEM do grupo (n = 5). Cada símbolo indica um animal individualmente. NS, não significativo (P > 0,05); * P < 0,05 e ** P < 0,01 (ANOVA). N=5

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que animais alimentados com dieta HSB apresentaram maior frequência de células TCD4⁺CD44⁺Foxp3⁻ e menor frequência de células TCD4⁺Foxp3⁺ e células TCD4⁺LAP⁺ no tecido adiposo quando comparados a animais alimentados com dieta AIN93G. Além disso, apresentaram menor secreção de citocinas importantes na indução da tolerância oral como IL-10 e TGF-β (MAIOLI, 2016). Avaliou-se no presente trabalho, se esse padrão se mantinha após a indução da TO. Os resultados mostraram que os animais que receberam dieta AIN93G e foram tratados com OVA de forma contínua apresentaram redução da frequência de células TCD4⁺CD44⁺Foxp3⁻LAP⁻ (Fig. 19a) e aumento da frequência de células TCD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺LAP⁺ (Fig. 19b,c) no TA. No entanto, não houve diferença na frequência dessas células em animais alimentados com dieta HSB independente no tipo de tratamento com OVA no TA.

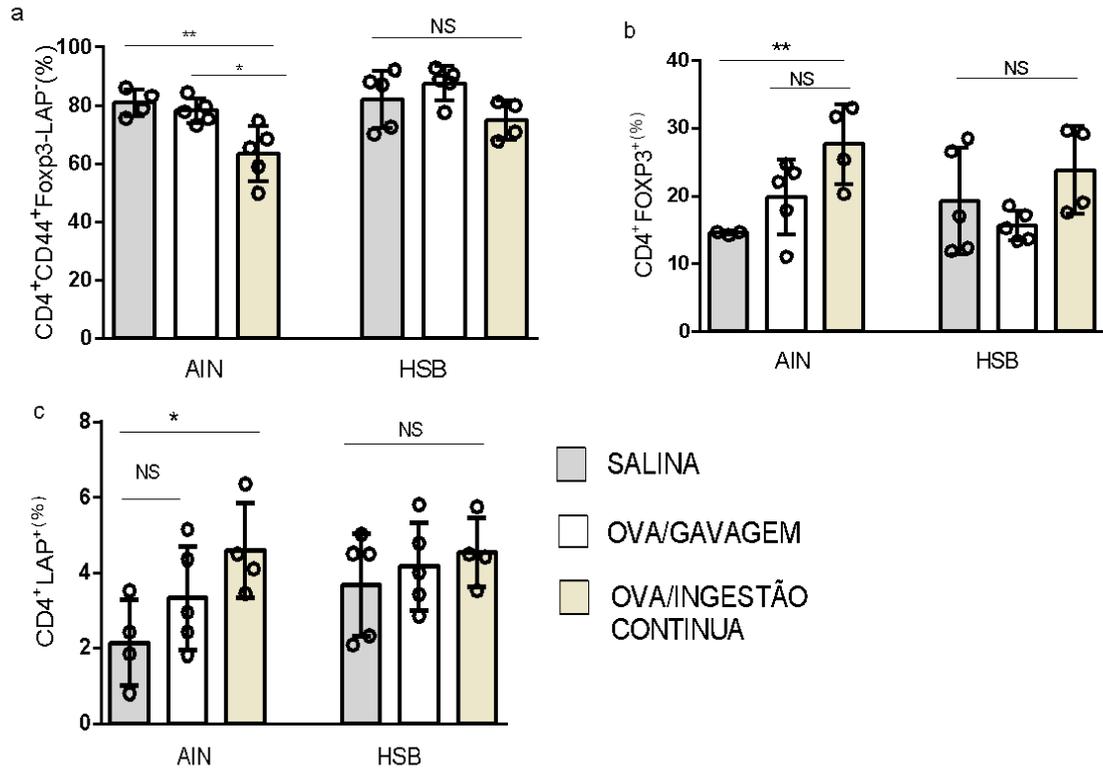


Figura 19: Alteração da população de células T efetoras e Tregs Foxp3+ e LAP+ no tecido adiposo após a indução de TO. Após a indução da tolerância oral com 10mg/OVA por gavagem ou por ingestão contínua de antígeno em animais tratados com dieta HSB ou AIN93G, foi avaliada, por meio de citometria de fluxo, a frequência de células (a) TCD4⁺CD44⁺, (b) TCD4⁺Foxp3⁺ e (c) TCD4⁺LAP⁺ isoladas do tecido adiposo epididimal. Todos os *gates* foram definidos a partir das células TCD4⁺ e a frequência foi calculada usando o software FlowJo. As barras representam a média ± SEM do grupo (n = 5). Cada símbolo indica um animal individualmente. NS, não significativo (P > 0,05); * P < 0,05 e ** P < 0,01 (ANOVA). N=5

6. DISCUSSÃO

A obesidade induz disfunções metabólicas e alterações da resposta imune que contribuem para o aparecimento de processo inflamatório na mucosa intestinal e doenças alérgicas, porém pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos (LUCK et al., 2015; YAMADA et al., 2016; DEVEREUX, 2006). Observamos, no presente trabalho, que camundongos com obesidade induzida por dieta apresentaram várias alterações na mucosa intestinal tais como aumento da permeabilidade intestinal, do número de células califormes e linfócitos intraepiteliais no duodeno, da produção de IgA secretória no lavado intestinal assim como da frequência de células dendríticas (CD103⁺ e CD103⁻) e de macrófagos. Essas alterações, no seu conjunto, sugerem que ocorrem repercussões na mucosa intestinal em fatores importantes na proteção da barreira epitelial e nas atividades imunológicas locais. Mostramos ainda que a tentativa de induzir TO em camundongos obesos falhou quando o antígeno foi administrado por gavagem, mas não por ingestão contínua (*continuous feeding*), que se aproxima melhor da forma fisiológica de ingestão diária de proteínas e apresenta uma eficácia muito maior na indução da tolerância (FARIA et al., 2003; OLIVEIRA et al, 2015). Isto demonstra que a suscetibilidade à indução dos mecanismos responsáveis pela tolerância oral está diminuída nesses animais. A TO pode ser entendida como um mecanismo fisiológico de reatividade imunológica imunorreguladora aos antígenos presentes na dieta e da microbiota desencadeado na mucosa intestinal, mas com repercussões sistêmicas já que ela envolve o controle de respostas imunes em outros sítios do corpo (WEINER et al., 2011). Assim, a indução da tolerância oral depende de condições locais (células dendríticas tolerogênicas, por exemplo) e também é um importante mecanismo de manutenção da homeostase imunológica em um local constantemente desafiado pelo contato com antígenos.

Paralelamente às alterações induzidas na mucosa intestinal em camundongos com obesidade induzida por dieta, observamos também alterações típicas da obesidade como a presença de hiperglicemia, dislipidemia e o aumento do tecido adiposo. Fatores associados a ingestão dietética são importantes no desenvolvimento da obesidade e no surgimento das disfunções metabólicas e imunes associadas (TORRES et al., 2018). A oferta da dieta HSB que contém açúcar e manteiga (fonte de gordura saturada) se assemelha ao teor de gordura e de carboidrato da maioria dos alimentos industrializados

geralmente consumidos por humanos obesos (KAU et al., 2011). O consumo dessa dieta induziu ganho de peso a partir da quinta semana de tratamento, aumentou o índice de adiposidade, causou hipertrofia dos adipócitos e levou ao surgimento de um infiltrado inflamatório no tecido adiposo, alterações não observadas nos animais que receberam dieta AIN93G. Sob condições fisiológicas, as funções metabólicas do TA são reguladas, mas, durante a obesidade, há modificações na arquitetura e na função do TA e em várias vias moleculares ocasionando fibrose, hipóxia, recrutamento de monócitos e produção de citocinas com perfil pró-inflamatório. Além disso, ocorre armazenamento ectópico de lipídeos, o que favorece o aumento das concentrações de LPS, FFA circulantes e esteatose hepática (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

Além do aumento do tecido adiposo, outros fatores associados à obesidade estavam presentes nos animais que consumiram a dieta HSB e ficaram obesos, como o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica, dislipidemia, hiperglicemia, aumento da permeabilidade intestinal e aumento do infiltrado celular no epitélio intestinal, dados que confirmam resultados de estudos prévios (CHANG; GOLDBERG, 1978).

A obesidade está associada à uma inflamação crônica de baixo grau que pode ser fator desencadeador de complicações associadas. Níveis circulantes aumentados de FFA livres, glicose e citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 em camundongos com obesidade induzida por dieta contribuem para o desenvolvimento de hiperglicemia e dislipidemia (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; OLEFSKY; GLASS, 2010). Níveis de glicose cronicamente elevados, como observados no diabetes *mellitus*, obesidade e distúrbios metabólicos associados à obesidade, como a doença hepática gordurosa não alcoólica, podem induzir efeitos bioquímicos e fisiológicos deletérios ao organismo, tais como a geração de produtos de glicação, toxicidade pancreática, e complicações macrovasculares e microvasculares que afetam praticamente todos os órgãos aumentando o risco de infecção e da mortalidade (BUTLER; BTAICHE; ALANIZ, 2005; LEITE et al., 2010; THAISS et al., 2018).

Cani e colaboradores, por outro lado, mostraram que a oferta de dieta hipercalórica somada ao tratamento de infusão contínua de LPS resultou em aumento do peso corporal, da glicemia de jejum, da adiposidade e de lesão hepática ainda na quarta semana de tratamento (CANI et al., 2007). Assim, parece que a soma de fatores

dietéticos e agentes microbianos que estimulam o sistema imune levam a alterações ainda mais rápidas e expressivas quando comparadas apenas às modificações dietéticas. Além disso, o LPS também pode entrar na circulação e no tecido adiposo através da captação por quilomícrons favorecendo ainda mais o aumento do infiltrado inflamatório no tecido adiposo (WINER et al., 2016).

Um trabalho recente trouxe ainda algumas questões importantes com relação ao papel de distúrbios associados à obesidade nas alterações da homeostase intestinal. Thaiss e colaboradores (THAISS et al., 2018) identificaram que a hiperglicemia, e não o excesso de peso associado à obesidade, pode interferir na homeostase e na integridade do epitélio intestinal. A hiperglicemia estaria associada ao aumento da permeabilidade intestinal que levaria ao influxo anormal de produtos microbianos culminando na disseminação sistêmica de produtos de microrganismos entéricos. Os autores mostram o papel da hiperglicemia ao restabelecer a integridade da barreira intestinal e interromper a disseminação sistêmica de produtos microbianos pela inibição do metabolismo da glicose via GLUT2. Assim, uma das possibilidades é que a hiperglicemia desencadeada pelo consumo da dieta HSB afete as células epiteliais intestinais de maneira semelhante, resultando em alterações da barreira intestinal aumentando sua permeabilidade e perturbando os mecanismos responsáveis pelo desencadeamento da tolerância oral. Dados recentes obtidos por nosso grupo podem ajudar a suportar essa hipótese, pois camundongos BALB/c que receberam dieta HSB não ficaram obesos, porém desenvolveram hiperglicemia, mesmo assim não foram capazes de desenvolverem TO quando receberam OVA por gavagem (dados não mostrados).

Além da hiperglicemia, outro aspecto que pode estar associado à obesidade e ao aumento da permeabilidade intestinal é a disbiose bacteriana intestinal. O intestino contém um abundante tecido linfóide associado a ele que está em constante contato com antígenos da dieta e com a microbiota intestinal. Um crescente número de evidências ligam a disbiose bacteriana ao desenvolvimento de obesidade e da intolerância à glicose (TURNBAUGH et al., 2006). Em camundongos, a análise da microbiota mostrou que a maioria das bactérias no intestino distal e nas fezes pertence a dois principais filos bacterianos, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (GILL et al., 2006). Em camundongos magros, existe um equilíbrio na composição dessa microbiota com representação balanceada de espécies bacterianas dos dois filos, mas, em camundongos obesos, há alterações na proporção entre esses filos (TURNBAUGH et al., 2006). Uma das condições associadas

à disbiose intestinal em camundongos é o aumento da permeabilidade intestinal, o que pode favorecer a passagem de bactérias ou dos produtos bacterianos, como o LPS, através da barreira intestinal aumentando a inflamação e estimulando a ativação do sistema imune (AMAR et al., 2011; CANI et al., 2008). Foi observado que o tratamento com antibióticos em camundongos obesos pode reduzir a adiposidade, a inflamação no tecido adiposo, melhorar o metabolismo da glicose e ainda diminuir a permeabilidade intestinal (CANI et al., 2008). Nesse cenário, seria importante avaliar se a manipulação da microbiota seria capaz de melhorar os aspectos da inflamação da obesidade e restaurar a susceptibilidade a indução da TO nos camundongos com obesidade induzida pela dieta HSB. Somados a essas alterações, outros fatores relacionados ao aumento da permeabilidade intestinal tais como a expressão de proteínas de junções firmes, como ocludinas e claudinas, podem ainda ser avaliadas neste modelo (CANI et al., 2008). A expressão dessas proteínas pode estar alterada na obesidade devido ao processo inflamatório gerado na mucosa intestinal.

Juntamente com as alterações na permeabilidade da mucosa intestinal em camundongos tratados com dieta HSB, foi possível identificar aumento do número de IELs e células caliciformes no duodeno, da produção de SIgA e redução na frequência de DCs com perfil mais tolerogênico nos LMNs, porém não foram observadas modificações na estrutura das vilosidades intestinais. Os IELs exibem características inatas e adaptativas (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011) e são caracterizados por altos níveis de expressão de marcadores de ativação ou inibição, como o CD69, receptores de migração intestinal (incluindo integrina $\alpha\text{E}\beta 7$ e receptor de quimiocina 9 (CCR9)) e receptores característicos de células NK (NKG2A ou NKG2D). Essas células parecem fornecer proteção imune imediata para evitar a entrada inicial e a disseminação de patógenos. No entanto, devido à sua proximidade com as células do epitélio intestinal, precisam exibir funções reguladoras e evitar respostas imunes inflamatórias excessivas que possam comprometer a integridade da barreira intestinal. Os metabólitos dietéticos e microbiota parecem ser importantes estimulantes para as IELs, pois a ausência de proteínas intactas da dieta tem impacto no número de IELs e estes estão em número muito reduzidos em camundongos *germ-free* (MENEZES et al., 2003), sugerindo a necessidade de sinais derivados do lúmen para seu desenvolvimento ou manutenção. No entanto, a ativação exacerbada da capacidade citotóxica das IELs pode induzir desordens inflamatórias, como doença celíaca e doenças inflamatória

intestinal. Infecções por bactérias patogênicas ou protozoários também induzem uma resposta dos IELs, alterando rapidamente sua motilidade e padrão de movimento entre as células epiteliais intestinais (FARIA; REIS; MUCIDA, 2017; HOYTEMA VAN KONIJNENBURG et al., 2017). A maioria dos IELs contém abundantes grânulos citoplasmáticos para atividade citotóxica e podem expressar citocinas efetoras, tais como IFN- γ , IL-2, IL-4 ou IL-17. Os IELs induzidos são escassos no início da vida, mas a população aumenta progressivamente com a idade em resposta à exposição a antígenos exógenos. Fatores endógenos e exógenos locais adicionais, como a citocina IL-15 e as vitaminas A e D, expandem e adaptam ainda mais o compartimento natural dos IELs (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011). Assim, no contexto da obesidade, o aumento do número de IELs pode estar correlacionado a maior ocorrência de estímulos devido à permeabilidade intestinal aumentada favorecendo o contato com antígenos e bactérias do lúmen intestinal. Além disso, já foi demonstrado que a presença altas concentrações de leptina, condição comum em camundongos obesos, também pode se associar ao aumento dos IELs (SIEGMUND; LEHR; FANTUZZI, 2002). A partir desses dados, será importante caracterizar quais são as sub-populações de IELs que estão em maior número no modelo estudado já que esses subtipos têm características fenotípicas e funcionais diferentes.

Também foi observado que os níveis de SIgA estão aumentados nas fezes de camundongos com obesidade induzida por dieta HSB. Pouco se sabe sobre o efeito e concentração da IgA na obesidade. Estudos em humanos mostram que indivíduos obesos apresentaram maiores níveis de IgA sérica, porém o aumento do nível de IgA nesses estudos está associado a infecção ou oxidação de LDL além do excesso de peso com (KATAOKA et al., 2012; VEKALA et al., 2013). Alguns pesquisadores associam o aumento da SIgA ao maior contato com bactérias patogênicas presentes no lúmen intestinal (WINER et al., 2016). A SIgA regula a microbiota intestinal e auxilia na manutenção da homeostase intestinal protegendo contra a ação de organismos invasores como bactérias patogênicas. Embora a SIgA também desempenhe um papel na resistência do hospedeiro a infecções, camundongos livres de patógenos específicos (SFP) apresentam concentrações abundantes de SIgA, enquanto que camundongos *germ-free* não, sugerindo que o principal papel da SIgA é manter o equilíbrio entre o hospedeiro e sua microbiota (CONG et al., 2009). Diante desses fatos, podemos inferir que o aumento nos níveis de SIgA no modelo de obesidade aqui retratado pode estar

relacionado a modificações na microbiota intestinal ou disbiose. Essa possibilidade merece verificação posterior. Entretanto, não existe correlação entre o aumento da produção de SIgA específica e a indução de tolerância oral quando comparadas diferentes linhagens de camundongos (STOKES; SWARBRICK; SOOTHILL, 1983). Karlsson e colaboradores mostraram que, em camundongos deficientes para o receptor de Ig polimérica (pIgR), que são incapazes de secretar IgA para o lúmen do intestino, ocorre aumento da resposta imune a bactérias comensais, entretanto eles continuam capazes de desenvolver tolerância oral (KARLSSON et al., 2010). De fato, no nosso estudo, não foram encontradas diferenças nas concentrações de SIgA entre os grupos após a indução de tolerância oral (dados não mostrados).

Wit e colaboradores mostraram que, como parte das alterações inflamatórias encontradas na obesidade, ocorre aumento da expressão gênica de algumas quimiocinas, como CCL5, na mucosa intestinal de camundongos obesos (DE WIT et al., 2008). Essa quimiocina atrai células imunes pró-inflamatórias, especialmente células Th1. Outros pesquisadores mostraram que camundongos tratados com dieta hipercalórica por 30 dias apresentaram redução, no íleo, nos níveis de RNAm para IL-22, IL-17 e IL-10, citocinas conhecidas por manter a integridade da barreira epitelial (HAMILTON et al., 2015; KLOPP; DOUIN-ECHINARD, 2015). Em animais tratados com dieta hiperlipídica também foi possível identificar um aumento de células Th1 produtoras de IFN- γ e de células TCD8⁺ tanto no intestino delgado, quanto no cólon (WINER et al., 2016). Assim, é possível verificar que as modificações na homeostase intestinal ocorridas durante a obesidade também apresentam um perfil inflamatório. Estas, no entanto, são muito menos conhecidas que aquelas já caracterizadas no tecido adiposo.

Um fator que deve ser considerado na manutenção da homeostase intestinal é a presença das DCs e dos macrófagos na lâmina própria e nos órgãos linfoides acessórios. Já foram descritos vários subtipos de DCs no tecido linfoide associado ao intestino e nos linfonodos mesentéricos que desempenham funções específicas. Na mucosa intestinal de camundongos e humanos, as células dendríticas CD103⁺ são aquelas que expressam níveis elevados da enzima RALDH2 (*Aldh1a2* mRNA) capaz de metabolizar a vitamina em ácido retinoico (AR) além de secretarem TGF- β . A apresentação de antígenos derivados do lúmen do intestino por essas células a linfócitos CD4⁺ nos linfonodos mesentéricos converte esses linfócitos em células T Foxp3⁺ com capacidade

reguladora (Treg) (COOMBES et al, 2007). A secreção de RA pelas DCs CD103+ também é essencial para a produção de SIgA na mucosa intestinal em conjunto com outros mediadores tais como TGF- β , IL-5 e IL-6 (MORA et al., 2006; UEMATSU et al., 2008) favorecendo a homeostase intestinal.

Por outro lado, Esterházy e colaboradores mostraram que a subpopulação de DCs CD103⁺CD11b⁻ dos linfonodos mesentéricos são aquelas que apresentam a maior expressam de RALDH2 sendo responsáveis não somente pela geração de células T reguladoras induzidas (iTregs) na mucosa intestinal, mas também pela indução de tolerância a antígenos administrados pela via oral (ESTERHAZY et al, 2016). Esse mesmo grupo mostrou em artigo recente que a drenagem linfática específica do segmento intestinal ocorre de forma compartimentada e influencia as células imunes nos LNMs, particularmente as DCs migratórias MHCII^{hi} assim como as DCs CD103⁺CD11b⁻ e CD103⁺CD11b⁺ envolvidas em respostas tolerogênicas e pró-inflamatórias, respectivamente (ESTERHÁZY *et al.* 2018). As DCs CD103⁻CD11b⁺ são mais frequentes nos LNMs duodenais apresentando uma assinatura menos inflamatória e expressando níveis mais baixos de receptores de citocinas inflamatórias tais como INF- γ e/ou IL-1 β quando comparado aos linfonodos que drenam o jejuno/íleo, cecal e do cólon. Em ensaios realizados na ausência de microbiota, foi mostrado ainda uma inversão da proporção de células DCs CD103⁺CD11b⁻ e CD103⁺CD11b⁺, aumentando a proporção de CD103⁺CD11b⁺. Esses achados sugerem os linfonodos duodenais são ambientes tolerogênicos devido à assinatura de DCs favoráveis e à drenagem preferencial de nutrientes para esses linfonodos. Além disto, essas características parecem impulsionadas pela presença da microbiota (ESTERHÁZY *et al.* 2018).

No nosso estudo, observamos que camundongos alimentados com dieta HSB que se tornaram obesos apresentaram redução na frequência das DCs CD103⁺CD11b⁺ nos linfonodos mesentéricos (LNMs). Além disto, a frequência da subpopulação de DCs CD103⁻CD11b⁺ também encontra-se reduzida nos LNMs dos animais alimentados com dieta HSB. Não examinamos as diferenças entre os linfonodos que drenam distintas partes do intestino. Seria interessante avaliar, a partir desses resultados preliminares, a frequência dessas células de forma compartimentalizada nos LNMs, principalmente os duodenais, em camundongos obesos na presença e ausência da microbiota.

Não examinamos tampouco a geração de células iTregs nos animais alimentados com a dieta HSB por 13 semanas. Este seria outro aspecto importante a ser investigado no futuro.

Observamos também uma redução na frequência de macrófagos nos LNMs de camundongos alimentados com HSB. O próximo passo para melhor interpretação desse resultado será confirmar o perfil dos macrófagos dos LNMs que se encontram reduzidos e avaliar também a frequência de diferentes subpopulações de macrófagos na LP de camundongos alimentados com dieta controle versus a HSB. Existem subtipos distintos de macrófagos que povoam tanto os LNMs quanto a lâmina própria do cólon de camundongos. Rivollier e colaboradores mostraram que macrófagos F4/80^{hi} CD11b⁺ CX3CR1^{hi} CD103⁻ são muito abundantes na lâmina própria (LP) do cólon e constituem uma população importante na manutenção da homeostase intestinal por sua capacidade de produção de altos níveis de IL-10 em animais *naive* parcialmente em resposta a antígenos da microbiota (RIVOLLIER et al., 2012). Segundo Hadis e colaboradores, camundongos CX3CR1^{-/-} tem a secreção de IL-10 por macrófagos reduzida assim como diminuição na frequência de células iTreg Foxp3⁺ na LP. Nesses camundongos, a indução de tolerância oral se encontra também comprometida ((JOERIS et al., 2017, HADIS et al., 2011). Assim, a frequência dessa população de macrófagos reguladores da mucosa colônica pode estar também reduzida na obesidade induzida pelo consumo de HSB e que esse defeito seja um dos fatores afetando a geração de células iTreg e na indução de tolerância oral nos animais obesos.

A exposição à grande quantidade de antígenos derivados dos alimentos e da microbiota exige uma resposta imune altamente regulada, pois respostas imunes ativas direcionadas contra a microbiota podem resultar em doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa (PABST; MOWAT, 2012). Já a falha em induzir tolerância às proteínas alimentares pode resultar em alergia alimentar (MERESSE et al., 2009). A capacidade do antígeno administrado por via oral de promover respostas imunes tolerogênicas subsequentes, de forma local e sistêmica favorecendo a manutenção da homeostase intestinal, pode atenuar respostas imunes inflamatórias e deletérias ao organismo e desempenhar papel central na homeostase imune em diversas doenças inflamatórias, inclusive na obesidade.

A administração de dose única de 10 mg OVA por via intragástrica (gavagem) não foi capaz de induzir tolerância oral nos camundongos alimentados com HBS, como constatado pela manutenção de títulos altos de IgG1 anti-OVA nesses animais quando

comparados aos animais do grupo controle tratados com salina. Por outro lado, observamos que camundongos alimentados com HBS e tratados com a mesma dose de OVA por ingestão contínua antes da imunização com OVA em alumínio apresentam uma redução significativa na resposta de IgG1 anti-OVA indicando não ocorre uma perda total da capacidade de indução de TO nesses animais. De fato, já foi descrito que a ingestão contínua de antígenos é a maneira mais eficaz de indução de tolerância oral (FARIA et al, 2003; OLIVEIRA et al., 2015). A inibição da IgG1 específica é uma medida bastante sensível de suscetibilidade à tolerância oral já que esse isotipo de imunoglobulina é o mais dificilmente inibido pela administração oral de antígenos (KELLER et al., OLIVEIRA et al., 2015).

Vários fatores podem interferir na indução da TO. A idade parece ser também um fator importante, já que tanto camundongos com sistema imune imaturo (neonatos) como os senescentes são resistentes à indução de TO (FARIA et al., 1998; SPEZIALI et al., 2018; VAZ et al., 1997). Foi descrito que a exposição neonatal ao superantígeno (enterotoxina *staphylococcal A*) do *Staphylococcus aureus* melhora a indução de TO em modelo murino de alergia de vias aéreas (LÖNNQVIST et al., 2009). Já a administração oral neonatal de antígenos de mielina aumentou a encefalomielite autoimune experimental (EAE) em animais adultos, enquanto que a administração oral desses antígenos em adultos conferiu proteção (MILLER et al., 1994). Nesse estudo descrevemos que fatores nutricionais, como a obesidade, também têm a capacidade de alterar a suscetibilidade à tolerância oral.

Entre mecanismos importantes para a indução da TO está a produção das citocinas TGF- β e IL-10 por linfócitos T específicos induzidos na mucosa mediante a administração oral de antígenos (FARIA et al., 2003; WEINER, 2001; MUCIDA et al., 2005a). Ao avaliar a produção de citocinas por células de baço e de LNMs dos camundongos com obesidade induzida pela dieta HBS, não foram observadas alterações na produção de IL-10 comparando-se os animais que receberam OVA por via oral com os que não receberam. Já nos animais controles que consumiram a dieta AIN93G, houve diminuição da produção de IL-10 por células de baço, mas não por células de LNMs dos animais que receberam o antígeno por via oral. Mucida e colaboradores mostraram que, na ausência de células Tregs Foxp3⁺ derivadas do timo, a IL-10 não foi necessária para a indução da TO, apesar de sua capacidade na indução de células iTregs. No entanto, na ausência de IL-10, as citocinas IL-12 e IFN- γ , alvos de inibição mediada por IL-10 não foram reduzidas (MUCIDA et al., 2005).

Além disso, trabalhos anteriores que abordaram a atividade reguladora de células TCD4⁺ observaram que a produção de citocinas Th2, como IL-4, e não somente a IL-10, também pode suprimir a atividade de citocinas Th1 como IL-2 e IFN- γ (MELAMED et al., 1995) observada na tolerância oral. No entanto, a supressão mediada pela administração oral de antígenos é também efetiva em reações inflamatórias mediadas por células Th2, indicando que ambos os tipos de reatividade, Th1 e Th2, estão suprimidos na tolerância oral (VAZ et al., 1977; MOWAT et al., 1982). Em nosso estudo, tanto as citocinas Th1, representada pelo IFN- γ , como a própria IL-10, uma citocina imunorreguladora, se encontravam reduzidas em animais alimentados com AIN93G e tratados com OVA por via oral. O mesmo não foi observado nos animais obesos.

Diante da importância do TGF- β na indução e manutenção da TO (FARIA; WEINER, 2006c; OIDA; WEINER, 2010), investigamos as concentrações dessa citocina no sobrenadantes de cultura de células de baço. Observamos também um aumento da concentração de TGF- β no sobrenadante das células de baço dos animais que consumiram a dieta AIN93G e que receberam o antígeno por via oral quando comparados aos imunes, o que coincide com resultados de estudos prévios (MILLER et al., 1992; FUKAURA et al., 1996). No entanto, os camundongos com obesidade induzida por dieta não apresentaram diferença quando comparamos os sobrenadantes de cultura de células de animais que receberam o antígeno por gavagem com os aqueles que não receberam. Maioli e colaboradores mostraram que a concentração de IL-10 e TGF- β estão reduzidas no tecido adiposo de camundongos obesos tratados com dieta HSB (MAIOLI, 2016). Além de estimular a indução de células Tregs importantes na TO, o TGF- β parece ter um papel na homeostase tanto de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de ocorrência natural quanto aquelas geradas periféricamente (MILLER et al., 1994). Já foi demonstrado também que o tratamento com anticorpos anti-TGF- β antes, durante e imediatamente após a administração oral da OVA reverteu a supressão da inflamação eosinofílica das vias aéreas induzida pela administração oral de OVA (MUCIDA et al., 2005), o que ressalta a importância dessa citocina na indução da tolerância oral (MUCIDA et al., 2005; FARIA; WEINER, 2006b). Assim, a falha das células de órgãos linfoides nos obesos em induzir aumento da concentração de TGF- β pode também ser um aspecto importante da dificuldade de indução de TO em animais obesos.

Por fim, enquanto que, nos camundongos alimentados com dieta AIN93G que receberam a OVA por via oral, observamos redução na produção de IFN- γ como esperado para a TO, identificamos aumento da concentração de IFN- γ no sobrenadante de células tanto do baço quanto dos LNMs após tratamento com OVA em animais alimentados com dieta HSB. A obesidade induzida por dieta promove uma mudança nas populações de células imunes na LP do intestino para um padrão inflamatório caracterizado pela redução das células Treg Foxp3⁺, aumento das células Th1 e TCD8⁺ produtoras de IFN- γ (LUCK et al., 2015). O IFN- γ tem efeitos deletérios na barreira intestinal induzindo a redução ou dissociação de proteínas de junção como ZO-1 e ocludina (BEAUREPAIRE; SMYTH; MCKAY, 2009).

Segundo Luck e colaboradores, camundongos deficientes em IFN γ alimentados com dieta hipercalórica mostraram permeabilidade intestinal reduzida, sugerindo que as células secretoras de IFN- γ são pelo menos parcialmente responsáveis pelo aumento da permeabilidade da barreira intestinal em camundongos obesos (LUCK et al., 2015). Por outro lado, camundongos tolerizados pela via oral mostram uma produção transitória de IFN- γ logo após a sensibilização com o antígeno, mas sua expressão é regulada negativamente após a imunização de reforço e se mantém reduzida posteriormente (CASTRO-JUNIOR et al., 2012). Como a redução da concentração de IFN- γ não foi observada no baço e nos LNMS de animais obesos que receberam OVA, o que podemos sugerir é que o contato prévio com a OVA tenha atuado como um *priming* induzindo diferenciação de células secretoras de IFN- γ , ou seja, um processo de imunização oral. No entanto, outros parâmetros também devem ser avaliados, como frequência de células secretoras de IFN- γ na mucosa intestinal, manutenção das células secretoras de IFN- γ nos órgão linóides e na mucosa intestinal, presença de células que possam influenciar também a barreira intestinal, tais como células linfóides inatas (ILCs) produtoras de IL-22 e células Tregs (CONG et al., 2009).

As Tregs são importantes para o mecanismo de regulação imune e possuem efeito protetor em várias condições como em doenças autoimune e alergias. Assim, outro fator que também pode estar associado com a falha na indução de TO em animais obesos tratados com OVA por gavagem é a redução da geração e manutenção de células Tregs nos LNMs. Por isso, analisamos a frequência dessas células nos LNMs após a indução de TO. Nos camundongos que receberam a dieta controle AIN93G tolerantes, a frequência das células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ e TCD4⁺LAP⁺ (reguladoras produtoras de TGF- β) estava aumentada nos LNMs, tanto após a administração de OVA por gavagem,

quanto por ingestão contínua de antígeno. No caso dos obesos, houve aumento na frequência de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ e de TCD4⁺LAP⁺ somente nos LNMs de animais que receberam antígeno por ingestão contínua e que, portanto, se tornaram tolerantes.

Além disto, observamos um aumento da frequência de células Tregs e de TCD4⁺LAP⁺ no tecido adiposo em camundongos tratados com dieta AIN93G mas não com a dieta HBS.

A tolerância oral é um fenômeno que se inicia na mucosa intestinal e se estende por todo o organismo, e é dependente da geração de células T reguladoras na periferia (WORBS et al., 2006). As células Tregs periféricas (pTregs) ou induzidas (iTregs) são tão essenciais para a indução de tolerância oral enquanto que as Tregs naturais ou tímicas são dispensáveis (CUROTTO-LAFAILLE et al, 2007; MUCIDA et al., 2005). Além disto, as células Th3 também podem exercer o papel de iTregs (CD4⁺LAP⁺) ou ainda promover o desenvolvimento de células iTregs Foxp3⁺ via produção de TGF- β . Para que a tolerância oral seja estabelecida, é necessário que DCs que expressam a integrina $\alpha E \beta 7$ (CD103) migrem da lâmina própria carregando antígeno para os LNMs onde auxiliam na diferenciação de células TCD4⁺ *naive* em células TCD4⁺Foxp3⁺ (WORBS et al, 2006). Em animais obesos, há menor frequência dessas células nos LNMs, mas ainda é necessário avaliar se essas células também estão reduzidas na LP e se essas alterações na frequência de células TCD4⁺Foxp3⁺ comprometem o desenvolvimento da TO.

Por outro lado, Wang e colaboradores mostraram que a absorção intestinal de gordura dietética promove a absorção de lipopolissacarídeos derivados do intestino e de antígenos proteicos devido a presença destes nos quilomícrons (WANG et al., 2010). Os quilomícrons são eliminados em parte no tecido adiposo promovendo resposta imune tolerogênica ou inflamatória e esse processo pode estar relacionado ao aumento de Tregs no TA de animais magros tratados com a dieta AIN93G.

Outro fator importante na diferenciação de Tregs em animais obesos são as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo. A adiponectina, resistina e a leptina são adipocinas secretadas pelo tecido adiposo e que desempenham papéis importantes na homeostase metabólica (GUILHERME et al., 2008). Estudo prévio do nosso grupo realizado em camundongos tratados com dieta HSB identificou níveis aumentados de resistina e leptina e redução da concentração de adiponectina em camundongos obesos

em comparação ao grupo controle (MAIOLI et al., 2016). A resistina é uma adipocina pró-inflamatória geralmente elevada em indivíduos obesos e associada à resistência à insulina, já a adiponectina está associada a maior tolerância à glicose e maior sensibilidade a insulina (MAIOLI, 2015). Um estudo realizado previamente em nosso laboratório identificou aumento da concentração sérica de leptina e uma redução de Tregs no tecido adiposo em camundongos tratados com dieta HSB (MAIOLI, 2016). Por outro lado, camundongos deficientes em leptina (ob/ob) ou em seu receptor (db/db) apresentam maior proliferação de células Tregs (MORAES-VIEIRA et al., 2014; DE ROSA et al., 2007, CAO et al., 2007). Outro aspecto que deve ser considerado são algumas características do metabolismo celular das Treg, como a expressão de receptores de leptina que podem ser importantes na relação direta entre adiposidade e redução na diferenciação de iTregs. REIS e colaboradores mostraram que a expressão do receptor de leptina por linfócitos T CD4⁺ em camundongos obesos participa na sinalização, via STAT3, para a diferenciação para células Th17 (REIS et al., 2015). Como a diferenciação de Th17 e Tregs Foxp3⁺ se regulam pela expressão diferencial de ROR γ t versus Foxp3 (MUCIDA et al, 2007), o estímulo para a diferenciação de células Th17 no tecido adiposo ou na mucosa intestinal via receptor de leptina pode levar à redução na geração de iTregs Foxp3⁺.

Assim, a hiperleptinemia e o aumento da concentração de resistina presente nos animais com obesidade induzida por dieta HSB podem interferir na diferenciação de células iTregs e conseqüentemente em importantes mecanismos do desenvolvimento da TO. Os dados aqui apresentados sugerem que a obesidade provocada pelo consumo de dieta hipercalórica modifica a homeostase intestinal e leva a resistência em indução da tolerância imune aos antígenos da dieta administrados por gavagem.

Porém, ainda há muito o que se explorar nessa área. Um grande desafio é identificar como a obesidade e a síndrome metabólica mudam a resposta imune, alterando aspectos dessa resposta na mucosa intestinal ou a nível sistêmico. A identificação dos mecanismos de interferência da obesidade na indução de tolerância oral poderá esclarecer o motivo da maior ocorrência e maior gravidade de doenças alérgicas e autoimunes em indivíduos obesos.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a obesidade induzida por dieta hipercalórica está associada a indicadores inflamatórios na mucosa intestinal e resulta na redução da suscetibilidade à indução da tolerância oral. Esse ambiente inflamatório afeta a mucosa aumentando a permeabilidade intestinal e provavelmente afeta células dos órgãos linfoides associados à mucosa (LNMs) tais como células dendríticas e macrófagos.

A resposta imune ao antígeno solúvel administrada via oral pode ser importante na regulação da inflamação de baixo grau presente na obesidade, tanto nos tecidos metabólicos sistêmicos quanto locais. O tratamento oral com antígenos solúveis em camundongos obesos leva a alterações na produção de citocinas de perfil pró-inflamatório nos órgãos linfoides. Essas alterações podem contribuir para inflamação sistêmica de baixo grau. Assim, avaliar os mecanismos que levam à diminuição na suscetibilidade à indução da TO poderia ajudar a desvendar estratégias para amenizar sintomas ou para prevenir a ocorrência de doença inflamatória intestinal sendo a vacinação oral uma das possibilidades em indivíduos obesos. No entanto, para isso, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem a obesidade e a TO faz-se necessária.

8. PERSPECTIVAS

1. Avaliar outras características da mucosa intestinal de animais obesos (expressão de mucina e de proteínas de junções paracelulares)
2. Avaliar as concentrações séricas de leptina, adiponectina e resistina;
3. Avaliar a frequência de subpopulações de DCs e Tregs nos LNMs de forma compartimentalizada antes e após a indução da TO;
4. Avaliar a proliferação de células Tregs na LP, nos LNMs e baço na presença e ausência de leptina associado ou não a hiperglicemia;
5. Avaliar resposta celular e humoral de animais obesos tratados com OVA de forma contínua;
6. Avaliar se a hiperglicemia induzida por STZ interfere na indução de TO;
7. Avaliar se hiperglicemia induzida por dieta (confeitaria) interfere na indução da TO;
8. Avaliar se o tratamento da hiperglicemia pela obesidade induzida pela dieta HSB melhora a indução de TO;
9. Avaliar a produção de citocinas em diferentes fragmentos do intestino, principalmente duodeno;
10. Verificar se a microbiota intestinal de animais obesos interfere na indução da TO;
11. Avaliar se a memória celular dos animais tratados com dieta HSB é similar aos controles, e se isso interfere na manutenção da TO;

Agradecimentos

Tenho muito a agradecer nestes dois anos e MEIO (Graças ao Gabriel).

A Deus pelo dom da vida e fé!

Aos meus pais e familiares, que me apoiam em tudo mesmo não concordando com minhas escolhas.

A Ana Maria e Tatiani Maioli, por serem duas das mulheres mais fortes e inteligentes que já conheci; por estarem em todas situações ao lado de seus alunos. Foram e são minha base e apoio.

Ao Momtchilo Russo, por abrir as portas de seu laboratório para uma aluna que não sabia o que era imunologia. Pela paciência e ensinamentos. Mom é o cara!

A Eliane e Denise, por todo carinho e ensinamentos. Depois do encontro com vocês, a ciência ficou mais clara e mais bonita.

A Fernanda, meu Deus!, o maior coração que conheci. Mulher forte, inteligente e AMIGA. Eu sou mais forte por você.

Ao meu compadre e melhor amigo Silas, você é muito mais do que pensa para mim e para as pessoas que cativa e se deixa cativar!

A Mariana Camila, minha amiga e companheira de trabalho e fora dele. Você foi e é um dos melhores ganhos que a ciência me deu!

A família LIB Núbia, Sarah, Natalia, Vinicius, Caixeta, Luísa, Carlos, Juliana, Dani, Mauro, Mariana Almeida, Mariana, Marina, Luiz, Ana...

Ao Hermes e Ildinha, por cuidarem tão bem dos nossos camundongos, e, claro, pela parceria e amizade.

Por fim e não menos importante, o bebê mais lindo do mundo que me trouxe maturidade e muito aprendizado de vida. Filho, mamãe te ama!

Thanks

9. REFERÊNCIAS

- AGACE, W. W.; PERSSON, E. K. How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 1, p. 42–48, 2012.
- AMAR, J. et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: Evidence for a concept. **Diabetologia**, v. 54, n. 12, p. 3055–3061, 2011.
- ANDERSEN, C. J.; MURPHY, K. E.; FERNANDEZ, M. L. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. **Adv Nutr**, v. 7, p. 66–75, 2016.
- ANNES, J. P. Making sense of latent TGFbeta activation. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 2, p. 217–224, 2003.
- ASSAY, C.; DENDRITIC, H. Isolation and Identification of Conventional Dendritic Cell Subsets from the Intestine of Mice and Men. v. 1423, p. 189–198, 2016.
- BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11–22, 2011.
- BEAUREPAIRE, C.; SMYTH, D.; MCKAY, D. M. Interferon- γ Regulation of Intestinal Epithelial Permeability. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 3, p. 133–144, 2009.
- BOLLRATH, J.; POWRIE, F. M. Controlling the frontier: Regulatory T-cells and intestinal homeostasis. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 5, p. 352–357, 2013.
- BRANDTZAEG, P.; JOHANSEN, F. E. Mucosal B cells: Phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. **Immunological Reviews**, v. 206, n. 1, p. 32–63, 2005.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DE DOENÇAS E AGRAVOS NÃO; SAÚDE., T. E P. DA. **Vigitel Brasil 2016**. [s.l: s.n.].
- BUTLER, S. O.; BTAICHE, I. F.; ALANIZ, C. Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients. **Pharmacotherapy**, v. 25, n. 7, p. 963–976, 2005.
- CANI, P. D. et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 56, n. July, p. 1761–1772, 2007.
- CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. v. 57, n. 6, p. 1470–1481, 2008.
- CAO, X. et al. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. **Immunity**, 2007.

CASTRO-JUNIOR, A. B. et al. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 2, p. 171–181, 2012.

CHANG, T. W.; GOLDBERG, A. L. FROMMICE TOMEN: Insights into the Insulin Resistance Syndromes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 10, p. 3677–3684, 1978.

CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 7, p. 445–456, 2011.

CHIANG, S. et al. The Protein Kinase IKK 3 Regulates Energy Balance in Obese Mice. **Cell**, v. 138, n. 5, p. 961–975, 2009.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, 2005.

CONG, Y. et al. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 46, p. 19256–19261, 2009.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1757–1764, 2007a.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1757–1764, 2007b.

CRISTANCHO, A. G.; LAZAR, M. A. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 722–734, 2011.

DA SILVA MENEZES, J. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **International Immunology**, v. 15, n. 3, p. 447–455, 2003.

DE FARIA, A. M. C. et al. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 102, n. 1, p. 67–80, 1998.

DE ROSA, V. et al. A Key Role of Leptin in the Control of Regulatory T Cell

Proliferation. **Immunity**, v. 26, n. 2, p. 241–255, 2007.

DE WIT, N. J. et al. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. **BMC Medical Genomics**, v. 1, n. 1, p. 14, 2008.

DEVEREUX, G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: Food for thought. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 11, p. 869–874, 2006.

DI CESARE, M. et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.

EDBERG, S. et al. Recognition of Commensal Microflora by Toll- Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. **Cell**, v. 118, n. February, p. 229–241, 2015.

EDITORIAL, S. et al. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport : new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. v. 4, n. 6, p. 2–7, 2011.

ESTERHÁZY, D. et al. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T reg cells and tolerance. **Nature Immunology**, v. 17, n. 5, p. 545–555, 2016.

ESTERHÁZY, D. ET AL. Compartmentalized lymph node drainage dictates intestinal adaptive immune responses. **Research Quarterly**, n. September, p. 464–475, 2018.

FARACHE, J. et al. Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 581–595, 2013a.

FARACHE, J. et al. Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 581–595, 2013b.

FARIA, A. M. C. et al. Oral tolerance induced by continuous feeding: Enhanced up-regulation of transforming growth factor- β /interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Autoimmunity**, v. 20, n. 2, p. 135–145, 2003.

FARIA, A. M. C.; REIS, B. S.; MUCIDA, D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 5, p. 1211–1226, 2017.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance Immunological activities in the gut mucosa ok. 2005.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases. 2006a.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 5, n. 3, p. 179–90, 2006b.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. **Clinical & developmental immunology**, v. 13, p. 143–57, 2006c.

FARIA, A. M. et al. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. **Immunology**, v. 78, n. 1, p. 147–51, 1993.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Advances in immunology**, v. 73, p. 153–264, 1999.

FERGUSON, A.; MURRAY, D. **Ferguson, A. & Murray, D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. Gut 12, 988-994.** [s.l: s.n.]. v. 12

FROSSARD, C. P. et al. Gut T cell receptor- $\gamma\delta$ +intraepithelial lymphocytes are activated selectively by cholera toxin to break oral tolerance in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 180, n. 1, p. 118–130, 2015.

FUKAURA, H. et al. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 1, p. 70–77, 1996.

GARCIA-MARAVAR, A. Factors Affecting Pellet Quality. p. 21–35, 2015.

GARSIDE, P. et al. T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 11, p. 5649 LP-5655, 1 jun. 1995.

GEIGER, T. L. IL-10 engages macrophages to shift Th17 cytokine dependency and pathogenicity during T cell-mediated colitis. p. 1–29, 2015.

GILL, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355–1359, 2006.

GOMEZ-HERNANDEZ, A. et al. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. **International journal of**

endocrinology, v. 2016, p. 1216783, 2016.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367–377, 2008.

HADIS, U. et al. Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 237–246, 2011.

HALBERG, N. et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 16, p. 4467–4483, 2009.

HAMILTON, M. K. et al. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 308, n. 10, p. G840–G851, 2015.

HERSOUG, L. G.; LINNEBERG, A. **The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: Does obesity induce decreased immune tolerance? Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2007.

HILL, J. A. et al. Retinoic Acid Enhances Foxp3 Induction Indirectly by Relieving Inhibition from CD4+CD44hi Cells. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 758–770, 2008a.

HILL, J. A. et al. Retinoic Acid Enhances Foxp3 Induction Indirectly by Relieving Inhibition from CD4+CD44hi Cells. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 758–770, 2008b.

HOLLAND, W. L. et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. **Nature Medicine**, v. 17, p. 55, 26 dez. 2010.

HORI, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. v. 1057, n. 2003, 2013.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993a.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993b.

HOTTA, K. et al. Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients. 2000.

HOYTEMA VAN KONIJNENBURG, D. P. et al. Intestinal Epithelial and Intraepithelial T Cell Crosstalk Mediates a Dynamic Response to Infection. **Cell**, v. 171, n. 4, p. 783–794.e13, 2017.

HRUBY, ADELA; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.

JO, J. et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 3, 2009.

JOERIS, T. et al. Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 4, p. 845–864, 2017.

KATAOKA, H. et al. Overweight and obesity accelerate the progression of IgA nephropathy: prognostic utility of a combination of BMI and histopathological parameters. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 16, n. 5, p. 706–712, out. 2012.

KAU, A. L. et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 327–336, 2011.

KHAN, T. et al. Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 6, p. 1575–1591, 2009.

KLOPP, P.; DOUIN-ECHINARD, V. The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease Clinical and Translational Report The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease. p. 100–112, 2015.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Publishing Group**, 2016.

LEITE, S. A. et al. Impact of hyperglycemia on morbidity and mortality, length of hospitalization and rates of re-hospitalization in a general hospital setting in Brazil. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2010.

LÖNNQVIST, A. et al. Neonatal exposure to staphylococcal superantigen improves induction of oral tolerance in a mouse model of airway allergy. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 2, p. 447–456, 2009.

LUCK, H. et al. Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 527–542, 2015.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MAIOLI, T. U. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of. 2015.

MAIOLI, T. U. et al. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic

syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. **Inflammation Research**, v. 65, n. 2, 2016.

MANUSCRIPT, A.; STRUCTURES, T. Preferential Expression of Integrin $\alpha\beta 8$ Promotes Generation of Regulatory T Cells by Mouse CD103+ Dendritic Cells. v. 6, n. 5, p. 247–253, 2009.

MATTEOLI, G. et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. **Gut**, v. 59, n. 5, p. 595–604, 2010.

MAZZINI, E. et al. Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 248–261, 2014.

MELAMED, D. et al. Peripheral tolerance of T h 2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. v. 8, n. 5, p. 717–724, 1995.

MELAMED, D. et al. Peripheral tolerance of T h 2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. v. 8, n. 5, p. 717–724, 2018.

MERESSE, B. et al. Celiac disease: From oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 1, p. 8–23, 2009.

MILLER, A. et al. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 1, p. 421–425, 1992.

MILLER, A. et al. Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 5, p. 1026–1032, 1994.

MILLER, V. et al. Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2037–2049, 2017.

MITO, N. et al. Oral-tolerance induction in diet-induced obese mice. v. 79, p. 1056–1061, 2006.

MORA, J. R. et al. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. **Science**, v. 314, n. 5802, p. 1157–1160, 2006.

MORAES-VIEIRA, P. M. M. et al. Leptin deficiency impairs maturation of dendritic cells and enhances induction of regulatory T and Th17 cells. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 3, p. 794–806, 2014.

MOWAT, A. M. To respond or not to respond — a personal perspective of intestinal tolerance. **Nature Reviews Immunology**, 2018.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 2014.

MOWAT, A. M. et al. Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. **Immunology**, v. 45, n. 1, p. 105–113, 1982.

MUCIDA, D. et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **The Journal of clinical Investigation**, v. 115, n. 7, p. 1923–1933, 2005a.

MUCIDA, D. et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **The Journal of clinical Investigation**, v. 115, n. 7, p. 1923–1933, 2005b.

MUCIDA, D. S. et al. **Decreased nasal tolerance to allergic asthma in mice fed an amino acid-based protein-free diet**. Annals of the New York Academy of Sciences. **Anais...2004**

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.

NG, M. et al. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 2014.

NIESS, J. H. et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. **Science**, 2005.

NISHIMURA, S. et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 914–920, 2009.

OIDA, T.; WEINER, H. L. TGF- β induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. **PLoS ONE**, v. 5, 2010.

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. **Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance**. [s.l: s.n.]. v. 72

OLIVEIRA, R. P. et al. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. **Journal of Immunological Methods**, 2015.

PABST, O. et al. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: Dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 1, p. 98–107, 2005.

PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 12, p. 821–832, 2012.

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal immunology**, v. 5, n. 3, p. 232–9, 2012.

PUCINO, V. et al. Regulatory T cells, leptin and angiogenesis. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 99, p. 155–169, 2014.

RESCIGNO, M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nature Immunology**, v. 2, p. 361, 1 abr. 2001.

REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. History and mechanisms of oral tolerance. **Seminars in Immunology**, v. 30, n. July 2016, p. 3–11, 2017.

RIOS, M. J. et al. Tolerance induction and immunological priming initiated by mucosal contacts with protein antigens in inbred strains of mice. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 21, n. 4, p. 825–36, 1988.

RUSSO, M. et al. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. **Immunology Letters**, v. 61, n. 1, p. 15–23, 1998.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 3, p. 1151 LP-1164, ago. 1995a.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 3, p. 1151 LP-1164, 1 ago. 1995b.

SCHREIBER, H. A. et al. Intestinal monocytes and macrophages are required for T cell polarization in response to *Citrobacter rodentium*. v. 210, n. 10, p. 2025–2039, 2013.

SCOTT, C. L.; AUMEUNIER, A. M.; MOWAT, A. M. **Intestinal CD103 + dendritic cells: Master regulators of tolerance?** **Trends in Immunology**, 2011.

SEO, S. et al. Intestinal macrophages arising from CCR2. 2015.

SHERIDAN, B. S.; LEFRANÇOIS, L. Intraepithelial lymphocytes: To serve and protect. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 6, p. 513–521, 2010.

SHULL, M. M. et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v. 359, p. 693, 22 out. 1992.

SIEGMUND, B.; LEHR, H. A.; FANTUZZI, G. Leptin: A pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. **Gastroenterology**, v. 122, n. 7, p. 2011–2025, 2002.

SILVA, M. F. et al. Innate profiles of cytokines implicated on oral tolerance correlate with low- or high-suppression of humoral response. **Immunology**, 2010.

SPEZIALI, E. F. et al. Lifelong Maintenance of Oral Tolerance and Immunity Profiles in Mice Depends on Early Exposure to Antigen. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 87, n. 2, p. 73–79, fev. 2018.

SPIEKERMANN, G. M.; WALKER, W. A. Oral tolerance and its role in clinical disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 237–55, 2001.

SUN, K. et al. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 470–477, 2013.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. C. M.; SCHERER, P. E. P. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical ...**, v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 2011.

TAKAHASHI, T. et al. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25⁺ Cd4⁺ Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4. **The Journal of Experimental Medicine**, 2000.

TCHKONIA, T. et al. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, p. E298–E307, 2007.

TCHKONIA, T. et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 644–656, 2013.

THAISS, C. A. et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. **Science**, v. 359, n. 6367, p. 1376–1383, 2018.

TOBAGUS, I. T.; THOMAS, W. R.; HOLT, P. G. Adjuvant costimulation during secondary antigen challenge directs qualitative aspects of oral tolerance induction, particularly during the neonatal period. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 4, p. 2274–2285, 2004.

TORRE-VILLALVAZO, I. et al. Adiponectin synthesis and secretion by subcutaneous adipose tissue is impaired during obesity by endoplasmic reticulum stress. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. April 2017, 2018.

TORRES, L. et al. The Intriguing Relationship Between Obesity and Infection. v. 1, n. 1, p. 6–10, 2018.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–31, 2006.

VAZ, N. et al. Immaturity, ageing and oral tolerance. **Scandinavian journal of**

immunology, v. 46, n. 3, p. 225–9, set. 1997.

VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 60, n. 2, p. 110–115, 1977.

VAZ, N. M. et al. The conservative physiology of the immune system. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 36, n. 1, p. 13–22, jan. 2003.

VEHKALA, L. et al. Plasma IgA antibody levels to malondialdehyde acetaldehyde-adducts are associated with inflammatory mediators, obesity and type 2 diabetes. **Annals of Medicine**, v. 45, n. 8, p. 501–510, dez. 2013.

VERDOLIN, B. A. et al. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 34, n. 2, p. 211–9, fev. 2001.

WANG, Y. et al. T-lymphocyte responses to intestinally absorbed antigens can contribute to adipose tissue inflammation and glucose intolerance during high fat feeding. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

WEINBERG, S. E.; SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Review Mitochondria in the Regulation of Innate and Adaptive Immunity. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 406–417, 2015.

WEINER, H. L. Oral Tolerance: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens. **Annual Review of Immunology**, v. 12, n. 1, p. 809–837, 1994.

WEINER, H. L. Oral tolerance: Immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 11, p. 947–954, 2001a.

WEINER, H. L. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and TR1 and TH3 regulatory cells. **Nature Immunology**, v. 2, p. 671, 1 ago. 2001b.

WEINER, H. L. et al. **Oral tolerance Immunological Reviews**, 2011.

WEISS, J. M. et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 10, p. 1723–1742, 2012.

WELLS H.G; OSBORNE T.B. The Biological Reactions of the Vegetable Proteins
Author (s): H . Gideon Wells and Thomas B . Osborne Published by : Oxford
University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/30073318> Accessed :

02-06-2016 08 : 55 UTC Your use of the JSTOR archi. v. 8, n. 1, p. 66–124, 2016.

WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **World Health**

Organization technical report series, v. 916, p. i–viii-1-149-backcover, 2003.

WINER, D. A. et al. The intestinal immune system in obesity and insulin resistance.

Cell Metabolism, v. 23, n. 3, p. 413–426, 2016.

WINKLER, G. et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)- α protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF- α , soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level.

European Journal of Endocrinology, v. 149, n. 2, p. 129–135, 2003.

WOLTMAN, A. M.; REYAL, Y.; BONNET, D. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. p. 3150–3166, 2012.

WORBS, T. et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 519–527, 2006.

YAMADA, L. T. P. et al. Immunologic and metabolic effects of high-refined carbohydrate-containing diet in food allergic mice. **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 273–280, 2016.

YANG, H. et al. Obesity accelerates thymic aging. **Blood**, v. 114, n. 18, p. 3803–3812, 2009.

YE, R.; SCHERER, P. E. **Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity?** **Molecular Metabolism**, ago. 2013.

