



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

LÍCIA TORRES

**A obesidade associada a hiperglicemia compromete a indução  
de tolerância oral e agrava a alergia alimentar**

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientador: Dr. Tatiani Uceli Maioli

Belo Horizonte, 2021

Lícia Torres

**A obesidade associada a hiperglicemia compromete a indução  
de tolerância oral e agrava a alergia alimentar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial de obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Orientadora:** Ana Maria Caetano de Faria

**Coorientadora:** Tatiani Uceli Maioli

Belo Horizonte

2021

043 Torres, Lícia.

A obesidade compromete a indução de tolerância oral e agrava a reação alérgica [manuscrito] / Lícia Torres. - 2021.

184 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria. Co-orientador: Dr. Tatiani Uceli Maioli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Obesidade. 3. Hiperglicemia. 4. Sistema Imunológico. 5. Hipersensibilidade Alimentar. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Maioli, Tatiani Uceli. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LÍCIA TORRES.** Aos sete dias do mês de outubro de 2021 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "A obesidade compromete a indução de tolerância oral e agrava a reação alérgica", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o 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 resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Denise Moraes da Fonseca (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Kelly Grace Magalhães (Universidade de Brasília - UNB), aprovada; Dr. Pedro Vieira (Universidade de Campinas - UNICAMP), aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Tatiani Uceli Maioli - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

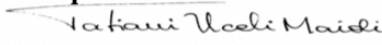
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 07 de outubro de 2021.

  
 Dra. Denise Moraes da Fonseca (Universidade de São Paulo)

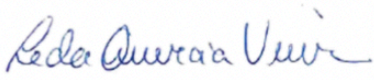
  
 Dra. Kelly Grace Magalhães (Universidade de Brasília - UNB)

  
 Dr. Pedro Vieira (Universidade de Campinas - UNICAMP)

  
 Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite (UFMG)

  
 Dra. Tatiani Uceli Maioli - Coorientadora (UFMG)

  
 Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)



Profª Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia

*Aos meus pais Claudete e Ivo, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora e amiga Tatiani Maioli muito obrigada! Tati foi e é fundamental na minha formação profissional e pessoal. Esteve presente em um dos momentos mais complicados de minha vida e não me deixou desaminar. Sem você nem sei se teria continuado.

Agradeço também a professora Ana Maria Caetano de Faria, por ter acreditado no meu trabalho, pelas trocas científicas e pela companhia no México. Ana é uma mulher incrível que apoia seus alunos em todos os sentidos. Espero ter ainda a oportunidade de aprender muito com você nesse novo ciclo que inicia.

Ao professor Momtchilo Russo o meu reconhecimento pelas trocas científicas e pelas conversas de vida. Obrigada por acreditar na menina “naive” que foi em seu laboratório sem saber nada. Você talvez não imagine, mas foi peça fundamental para o meu crescimento na ciência.

A Eliane pela paciência e ensinamentos hoje minha amiga e mentora. Espero compartilhar com você muitos momentos incríveis.

A Adaliene pela oportunidade e confiança. Não tenho palavras para agradecer a experiência que me proporcionou. A Geneviève minha supervisora e aos amigos da França Jean, Lise e Léa agradeço o carinho e as trocas científicas.

A Mariana Camila minha amiga, companheira de bancada e de vida. Agradeço a paciência, o carinho e as trocas de conhecimento. Você foi e é parte fundamental da minha formação e do desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus liabianos que são minha família Natalia, Mariana Oliveira, Helder, Vinicius Dantas, Felipe, Luisa, Pedro e Hermes. Sem vocês não haveria o mesmo brilho, carinho e alegria em trabalhar. Obrigada amigos!!

## RESUMO

A obesidade associada a hiperglicemia está correlacionada diretamente com a disfunção da barreira intestinal e com o risco de distúrbios inflamatórios intestinais. Então, resolvemos investigar se a quebra da homeostase intestinal provocada obesidade associada à hiperglicemia interferiria na indução da tolerância oral e afetaria o a ocorrência da alergia alimentar.

Primeiramente, utilizamos camundongos C57/BL6 tratados com dieta hipercalórica, rica em açúcar e manteiga (HSB) durante 13 semanas para indução de obesidade e comorbidades como a hiperglicemia.

Ao final de 13 semanas de tratamento com a dieta os animais estavam obesos e apresentaram alterações importantes na mucosa intestinal como aumento da permeabilidade intestinal, maior frequência de células caliciformes, e redução da frequência de células T regulatórias (Tregs) nos linfonodos mesentéricos duodenais e jejunais. Além disso, foi observada alteração na microbiota intestinal dos animais obesos. Dada a importância da homeostase da mucosa intestinal para o desenvolvimento da tolerância oral foi avaliado se a capacidade de indução de tolerância oral estava preservada. Observamos que os camundongos obesos foram resistentes ao desenvolvimento de tolerância oral ao considerar a resposta celular e humoral. Além disso, os camundongos controles magros que receberam OVA por via oral, tiveram frequência aumentada de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos linfonodos, porém nenhuma diferença foi encontrada na frequência de células TCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> em camundongos obesos que receberam OVA por via oral. Logo, os animais obesos foram refratários ao desenvolvimento da tolerância oral.

Existe uma correlação importante entre a hiperglicemia e quebra da homeostase intestinal. Afim de investigar se a hiperglicemia teria um papel na resistência à indução de tolerância oral, tratamos camundongos obesos com o modulador de glicemia Metformina (1g/L) por 21 dias, o que reduziu a glicemia de jejum nos camundongos obesos aos níveis encontrados em camundongos controle. O tratamento de camundongos obesos com Metformina resultou na restauração da indução de tolerância oral a OVA e melhorou a permeabilidade intestinal. Além disso, camundongos com hiperglicemia por tratamento com streptozotocina (modelo de diabetes tipo 1) também não desenvolveram tolerância

oral após a administração de OVA por via oral. O que confirma a relação entre hiperglicemia e resistência à indução de tolerância oral. A falha na indução da tolerância oral ou a quebra da homeostase intestinal pode resultar em alergia alimentar. Para verificar a relação da obesidade com a alergia alimentar os camundongos, após a indução de obesidade foram imunizados com OVA e receberam o desafio na água de beber. Os camundongos obesos alérgicos mostraram maior perda de peso e aumento significativo da secreção de IgG1 anti-Ova em comparação com camundongos controles magros alérgicos e tiveram a reação de anafilaxia cutânea passiva mais intensa que os animais magros, mostrando que a obesidade agrava a alergia alimentar.

Para investigar a tradução de nossos achados para a prática clínica em humanos, comparamos os níveis séricos de IgE de pacientes obesos com hiperglicemia (DM2) com níveis encontrados em indivíduos obesos com glicemia normal. Indivíduos com DM2 apresentam níveis séricos de IgE mais elevados quando comparados a pacientes obesos sem hiperglicemia. Além disso, avaliamos a expressão gênica em biopsias de jejuno de pacientes obesos com e sem hiperglicemia. Dentre os genes, identificamos a regulação negativa de IL-22, IL-10, Foxp3, ZO-1 e claudina 2 e a regulação positiva de IL-33 e IL-5 em obesos hiperglicêmicos.

Juntos, sugerem que a obesidade associada à hiperglicemia dificulta a indução de tolerância oral pela quebra da homeostase intestinal, e que a obesidade pode agravar os fenômenos alérgicos. Uma melhor compreensão da relação entre obesidade e respostas imunes mucosas pode ajudar a desenvolver novas estratégias terapêuticas para alergia alimentar com base em mecanismos de tolerância oral.

**Palavras-chave:** Tolerância oral, obesidade, hiperglicemia, sistema imunológico, imunologia da mucosa, alergias alimentares



## ABSTRACT

Obesity associated with hyperglycemia is directly correlated with intestinal barrier dysfunction and the risk for inflammatory bowel disorders. So, we decided to investigate whether the breakdown of intestinal homeostasis caused by obesity associated with hyperglycemia would interfere with the induction of oral tolerance and would affect the occurrence of food allergy.

First, we used C57/BL6 mice treated with a hypercaloric diet, rich in sugar and butter (HSB) for 13 weeks to induce obesity and comorbidities such as hyperglycemia.

At the end of 13 weeks of treatment with the diet, the animals were obese and showed important changes in the intestinal mucosa such as increased intestinal permeability, higher frequency of goblet cells, and reduced frequency of regulatory T cells (Tregs) in duodenal and jejunal mesenteric lymph nodes. In addition, changes in the intestinal microbiota of obese animals were observed. Given the importance of intestinal mucosa homeostasis for the development of oral tolerance, it was evaluated whether the ability to induce oral tolerance was preserved. We observed that obese mice were resistant to the development of oral tolerance when considering the cellular and humoral responses. In addition, lean control mice that received oral OVA had an increased frequency of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in lymph nodes, but no difference was found in the frequency of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells in obese mice that received oral OVA. Therefore, obese animals were refractory to the development of oral tolerance.

There is an important correlation between hyperglycemia and disruption of intestinal homeostasis. In order to investigate whether hyperglycemia would play a role in resistance to oral tolerance induction, we treated obese mice with the glycemetic modulator Metformin (1g/L) for 21 days, which reduced fasting glycemia in obese mice to the levels found in control mice. Treatment of obese mice with Metformin resulted in restoration of oral tolerance induction to OVA and improved intestinal permeability. Furthermore, mice with hyperglycemia caused by the treatment with streptozotocin (model of type 1 diabetes) also did not develop oral tolerance after oral administration of OVA. This confirms the relationship between hyperglycemia and resistance to oral tolerance induction. Failure to induce oral tolerance or disruption of intestinal homeostasis can result in food allergy. To verify the relationship between obesity and food allergy, after obesity induction, mice were immunized with OVA and challenged in drinking water.

Allergic obese mice showed greater weight loss, significant increase in anti-Ova IgG1 compared to allergic lean control mice, and had a more intense passive cutaneous anaphylaxis reaction than lean animals, showing that obesity aggravates food allergy.

To investigate the translation of our findings to clinical practice in humans, we compared the serum IgE levels of obese patients with hyperglycemia (DM2) with levels found in obese individuals with normal blood glucose. Individuals with DM2 have higher serum IgE levels when compared to obese patients without hyperglycemia. In addition, we evaluated gene expression in jejunal biopsies from obese patients with and without hyperglycemia. Among the genes, we identified the downregulation of IL-22, IL-10, Foxp3, ZO-1 and claudin 2, and the upregulation of IL-33 and IL-5 in hyperglycemic obese patients' genes. The genes are related with gut homeostasis and allergic diseases.

Together our data suggest that obesity associated with hyperglycemia makes it difficult to induce oral tolerance by breaking intestinal homeostasis, and that obesity can aggravate allergic phenomena. A better understanding of the relationship between obesity and mucosal immune responses may help to develop new therapeutic strategies for food allergy based on oral tolerance mechanisms.

oral.

**Keywords:** Oral tolerance, obesity, hyperglycemia, immune system, mucosal immunology, food allergies

## LISTA DE TABELAS

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

**Tabela 2:** Lista de *primers* específicos utilizados para detecção da expressão dos genes de interesse.

**Tabela 3:** Parâmetros clínicos e biológicos da coorte do estudo.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Mecanismo de desenvolvimento da tolerância oral  
Tabela 1: Composição das dietas utilizadas (AIN93G e HSB)

**Figura 2:** Posição anatômica dos linfonodos mesentéricos em camundongos

**Figura 3:** Estratégias de análise utilizadas para identificar populações de interesse.

**Figura 4:** Delineamento experimental para o estabelecimento de tolerância oral.

**Figura 5:** Teste de proliferação bacteriana das fezes de animais tratados com antibiótico

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

**Figura 7:** O consumo da dieta HSB provoca dislipidemia em camundongos obesos.

**Figura 8:** O consumo da dieta HSB resultou em alterações na resposta à glicose em camundongos

**Figura 9:** A frequências de linfócitos intraepiteliais e produção de muco estão aumentados em camundongos tratados com dieta HSB.

**Figura 10:** A obesidade induzida por dieta HSB resulta em alterações na mucosa intestinal.

**Figura 11:** A frequência de DCs tolerogênicas está reduzida em camundongos com obesidade induzida por dieta nos LNMs.

**Figura 12:** O consumo da dieta HSB interfere na microbiota intestinal.

**Figura 13:** A obesidade induzida por dieta está associada a falha na indução de tolerância oral ao antígeno administrado por gavagem.

**Figura 14:** A modulação da microbiota intestinal não altera a permeabilidade intestinal e não favorece a indução de tolerância oral em camundongos obesos

**Figura 15:** O tratamento com antibiótico (ABX) favorece a indução de tolerância oral em camundongos obesos.

**Figura 16:** O tratamento da hiperglicemia por Metformina restaurou a capacidade de induzir tolerância oral em camundongos obesos

**Figura 17:** O tratamento com STZ induz hiperglicemia, alteração da permeabilidade intestinal e resulta em falha na indução de tolerância oral.

**Figure 18:** A obesidade induzida por dieta agrava o desenvolvimento de alergia alimentar em camundongos.

**Figura 19:** IgE é associada com indicadores de hiperglicemia em humanos.

**Figura 20:** A obesidade associada ao DM2 altera a expressão de genes relacionados a resposta imune no jejuno.

**Figura 21:** A obesidade compromete a indução de tolerância oral e agrava a reação alérgica.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µl	Microlitros
ml	Mililitros
mg	Miligramas
Al(OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de Alumínio
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
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
FFA	Ácidos Graxos Livres
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino
GTT	Teste de Tolerância Oral a Glicose
HSB	High Sugar Butter
IFN	Interferon
i.p.	Intraperitoneal
IGF	Fator de crescimento Semelhante à Insulina
Ig	Imunoglobulinas

IL	Interleucina
LNМ	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- $\gamma$	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
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TO	Tolerância Oral
Tregs	Células T Reguladoras Específicas

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO .....	70
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS.....	99



## 1. INTRODUÇÃO

### A obesidade

A obesidade é definida como acúmulo excessivo de gordura corporal determinado por diversas causas. O acúmulo de gordura corporal não é necessariamente prejudicial à saúde de um animal. Embora a obesidade seja rara na natureza, existem animais naturalmente obesos, como as focas e os ursos polares. Além disso, nesses casos, o alto grau de adiposidade não impede, pelo contrário pode contribuir para sua aptidão, equipando-os para sobreviver em ambientes muitas vezes hostis (POND, 1998). Porém, a obesidade apresentada em humanos modernos, é acompanhada por inflamação e frequentemente por doenças e deficiências. Embora não haja uma vantagem clara e identificável em ser obeso, o limite para o acúmulo de gordura tolerável difere entre os indivíduos e pode ser determinado por variáveis ambientais e genéticas.

Nos últimos 50 anos, a ocorrência de obesidade humana aumentou significativamente em todo o mundo. Um estudo avaliou a prevalência mundial de sobrepeso e obesidade em crianças e adultos durante 1980-2013, e identificou que a proporção de adultos com excesso de peso alternou 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 e obesidade identificados em 2018 foi de 55,7% e 19,8%, respectivamente (BRASIL, 2019). Uma avaliação realizada com dados de 200 países dos anos de 1975 a 2014, observou 19,2 milhões de pessoas, e identificou um 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, e passou para a terceira posição em 2014. Com relação às mulheres obesas, o país passou 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.

Dentre os fatores envolvidos na gênese da obesidade, a alta ingestão de carboidratos e lipídeos se destaca como desencadeador da doença (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Miller V, *et al.*, (2017) avaliou o consumo de frutas, legumes e verduras que são considerados marcadores de uma alimentação adequada e

saudável em 18 países, com o total de 135335 participantes e identificou um maior consumo de frutas, legumes e verduras em indivíduos com nível mais alto de educação e etnia branca (MILLER, V. *et al.*, 2017). 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 que o consumo de frutas, verduras e legumes é inferior ao recomendado pela Organização Mundial da Saúde e Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (OMS/FAO), que orienta um consumo de pelo menos 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 e 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 (WHO, 2003).

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). Em condições de obesidade, o tecido adiposo pode se tornar severamente disfuncional apresentando alterações como aumento de tamanho e distribuição atípica no corpo.

O tecido adiposo é um órgão endócrino complexo importante na homeostase energética respondendo rapidamente e de forma dinâmica a alterações como privação ou excesso de nutrientes (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Além de adipócitos, o tecido adiposo possui também macrófagos, linfócitos, fibroblastos, progenitores celulares e células endoteliais. Esse tecido é responsável pela secreção de moléculas como leptina, adiponectina, citocinas e reguladores vasculares (angiotensina II e inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1)) (ANDERSEN, C. J.; MURPHY, K. E.; FERNANDEZ, M. L. 2016).

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 matriz extra celular mais rígida e com menor capacidade de

expandir para depositar lipídeos excedente, o que aumenta também a concentração de ácidos graxos livres e o depósito de lipídeos de forma ectópica em órgãos como fígado, músculo esquelético e 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 matriz extra celular, que envolve o tecido adiposo, quando alimentados com dieta rica em lipídeos, ou animais geneticamente deficientes para o gene da leptina (*ob/ob*), apresentaram um melhor *clearance* de glicose, redução do acúmulo de gordura ectópica e 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 matriz extra celular, 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 as das quinases reguladoras envolvidas na tensão de cisalhamento, como a ERK e JNK, foram significativamente reduzidas no adipócito na ausência de colágeno IV, o que também reduz a tensão de cisalhamento na membrana e torna a matriz extra celular mais flexível, reduzindo as restrições hemodinâmicas devido à fibrose do ambiente extracelular, permitindo assim, maior plasticidade e menor estoque de lipídios de forma ectópica (KHAN *et al.*, 2009).

Em adição às alterações estruturais, ocorrem também alterações na secreção de componentes pelos adipócitos. Ocorre aumento da secreção de citocinas tais como TNF- $\alpha$ , interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, leptina e resistina, e a redução paralela de IL-10 e adiponectina caracterizando, a obesidade como um estado inflamatório de baixa intensidade (CINTI *et al.*, 2005; HERSOUG; LINNEBERG, 2007; KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). 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), que promovem a ativação de vias de sinalização como as do IKK $\beta$  e do NF- $\kappa$ B, e das vias de sinalização pelos *receptores do tipo Toll* (TRL) (BAKER;

HAYDEN; GHOSH, 2011; CHIANG et al., 2009), o que também favorece o estado inflamatório.

Hotamisligil e colaboradores, na década de 90, mostraram que os níveis de TNF- $\alpha$  estavam aumentados em camundongos obesos (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Mais tarde, novos trabalhos correlacionaram positivamente o tamanho dos adipócitos com a concentração de TNF- $\alpha$  (WINKLER *et al.*, 2003). O TNF- $\alpha$  favorece a via de ativação do NF-kB, estimula a via de sinalização para 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).

Além disso, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam maior frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no tecido adiposo, e níveis aumentados de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando comparados a animais controle magros (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). A infiltração de TCD8<sup>+</sup> no tecido adiposo precede o acúmulo de macrófagos CX3CR1<sup>int</sup> que migram em resposta aos níveis aumentados de FFA, glicose e apoptose, amplificando o processo inflamatório local. Todos esses eventos contribuem para a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, liberação de proteína quimiotática de monócitos 1 e 3 (MCP-1) e MCP-3, e cria um ciclo de recrutamento celular contínuo com inflamação constante no tecido adiposo (NISHIMURA *et al.*, 2009).

Para além do tecido adiposo localizado na região abdominal, a obesidade favorece o depósito ectópico de lipídeos, o que compromete também a arquitetura e funcionalidade de 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 resultando na restrição da diversidade do repertório de receptores de células T (YANG *et al.*, 2009). Nos órgãos linfoides periféricos, ocorre redução da migração de células apresentadoras de antígenos (APCs) para linfonodos periféricos e conseqüente a diminuição na diferenciação de linfócitos T (WINER, D. A. *et al.*, 2016). Essas alterações levam à disfunção dos órgãos linfoides, 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 aos componentes da microbiota intestinal.

As alterações desencadeadas pela obesidade atingem também a mucosa intestinal. Sendo assim, animais obesos apresentam modificações na composição da microbiota,

aumento da permeabilidade intestinal e da concentração de bactérias ou produtos bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS) na circulação sanguínea (WINER, D. A. *et al.*, 2016). A ativação de vias de sinalização envolvendo TLR, em especial TLR4, pelo LPS bacteriano regula a fosforilação de proteínas e conduz a um aumento na produção de moléculas como o TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina, resistina e quimiocinas ligantes do receptor de quimiocina CC tipo 2 (CCR2), que está envolvido na migração de monócitos. Monócitos e macrófagos imaturos são os principais produtores de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) que causam danos teciduais e podem promover a diferenciação de células T *naive* em células Th1 e Th17, produtoras de IFN- $\gamma$  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). A soma desses fatores podem levar ao comprometimento da homeostase intestinal.

### **A mucosa intestinal e os mecanismos de homeostase e de indução de tolerância oral**

O intestino delgado humano contém aproximadamente  $10^{12}$  células linfoides por metro. Esse número de células excede o número encontrado em todos os outros órgãos linfoides juntos (MUCIDA *et al.*, 2004; REZENDE; WEINER, 2017). Essa característica faz do intestino o maior compartimento imune do corpo com a dupla função, fornecer resistência a toxinas e patógenos invasores, e manter a tolerância aos antígenos da dieta e da microbiota (MOWAT, 2018; FARIA; WEINER, 1999).

O epitélio intestinal é composto por enterócitos, células de Paneth, células caliciformes e células neuroendócrinas. As células de Paneth possuem papel antibacteriano crucial, pois produzem lisozima e peptídeos anti-microbianos como as defensinas. Essas células epiteliais especializadas são encontradas apenas no intestino delgado, particularmente no íleo. Por outro lado, a concentração de células caliciformes produtoras de muco aumenta progressivamente ao longo do trato gastrointestinal no sentido proximal-distal. A produção de muco é controlada por mediadores imunes incluindo leucotrienos e citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-9 e IL-13. O muco também tem papel

antimicrobiano formando um gel que atua como uma barreira física, além de ser composto por glicoproteínas (mucinas) que são tóxicas para muitas bactérias (MOWAT, ALLAN M.; AGACE, 2014).

Na parte central das vilosidades, localiza-se a lâmina própria (LP), um tecido que contém vasos sanguíneos e linfáticos que se comunicam com os linfonodos mesentéricos (LNMs), e muitas células do sistema imune inato e adaptativo. Os LNMs são locais críticos para o estabelecimento da imunidade adaptativa às perturbações lumenais onde são diferenciadas tanto em células T efetoras como células T reguladoras FOXP3<sup>+</sup> (Treg). Devido à presença de células com localização e função imune distintas ao longo do intestino, os LNMs agem como sítios comunicadores entre a mucosa que drenam e as vias periféricas de recirculação (via linfáticos aferentes) permitindo a mobilidade de células como das células dendríticas (DCs) (ESTERHÁZY, DARIA *et al.*, 2016). Esterházy e colaboradores (2019) mostraram que os LNMs proximais (duodenais e jejunais) apresentam características mais tolerogênicas devido à assinatura gênica das células imunes e estromais, e à maior frequência de DCs CD103<sup>+</sup> com capacidade de metabolizar ácido retinóico favorecendo a diferenciação de células T reguladoras TCD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> induzidas (iTreg) (ESTERHÁZY *et al.*, 2019). Essas características são impulsionadas pela microbiota intestinal que também tem composição distinta nos diversos segmentos do intestino (WORBS *et al.*, 2006a). A absorção de retinol realizada no duodeno é espelhada nos LNMs duodenais sendo dependente da via linfática e sugerindo que a rota linfática compartimentalizada permite a existência de nichos distintos ao longo do intestino para os órgãos linfoides. Isto contribui para a regionalização da resposta imune da mucosa intestinal (HILL *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2015). Além disso, a diferenciação em células Tregs induzidas diminuem ao longo da cadeia dos LNMs intestinais, de maneira proximal para distal (ESTERHÁZY, DARIA *et al.*, 2019).

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 IgA secretória (WEINER, HOWARD L. *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).

Em condições de perda da homeostase intestinal as alterações na barreira intestinal e a disbiose no intestino, como observado na obesidade, pode contribuir para a ocorrência de alguma perturbação do equilíbrio do sistema imune de mucosa, o que favorece uma disfunção no organismo de forma a desencadear o desenvolvimento de doenças, bem como dificultar a tolerância imune aos antígenos da dieta e da microbiota (FARIA, A. M.; WEINER, 1999; FARIA, ANA M. C.; WEINER, 2005; SPIEKERMANN; WALKER, 2001).

A tolerância aos antígenos ingeridos foi demonstrada inicialmente em 1911, Wells e Osborne mostraram que a administração oral de proteínas dietéticas, como a ovalbumina (OVA), previne reações anafiláticas subsequentes a essa proteína em cobaias (WELLS H.G; OSBORNE T.B., 1911). 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 as reações mediadas por linfócitos específicos (VAZ, NELSON M. *et al.*, 1977), a esse fenômeno foi dado o nome de tolerância oral (OT).

A tolerância oral é um fenômeno fisiológico que contribui para prevenir condições patológicas às proteínas alimentares e à microbiota comensal, inibindo respostas que poderiam causar danos, como reações de hipersensibilidade, proliferação de linfócitos e secreção de anticorpos (DA SILVA MENEZES *et al.*, 2003; MILLER, A. *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2010). Os mecanismos envolvidos na indução de tolerância oral são ainda alvo de debate. De acordo com Howard e colaboradores, o desenvolvimento da tolerância oral está correlacionado com a supressão ativa ou com a anergia clonal dependendo da dose e da frequência de administração do antígeno (CHEN *et al.*, 1995). O tratamento oral com doses altas de antígeno induziria a deleção de linfócitos T específicos mediada por apoptose, e o tratamento oral com doses baixas induziria a diferenciação de células T específicas reguladoras produtoras de TGF- $\beta$  e IL-4 (WEINER, H. L., 1994; WEINER, HOWARD L. *et al.*, 2011).

No entanto, os experimentos que mostraram a eliminação de linfócitos T específicos para o antígeno administrado por via oral utilizavam doses muito altas de antígeno (100mg OVA) e camundongos transgênicos (CHEN *et al.*, 1995). Esses dados nunca foram reproduzidos em camundongos convencionais quando foi utilizado doses mais fisiológicas de antígeno. Vários estudos posteriores mostraram que a indução de

tolerância oral está correlacionada com a indução de células T reguladoras (Treg) (Figura 1).

Em 1995, Sakaguchi e colaboradores descreveram que as células Treg são essenciais na tolerância imunológica aos auto-componentes e que essas células são caracterizadas como linfócitos TCD4<sup>+</sup> que expressam a cadeia alfa do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) (SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Este estudo mostrou que as transferências adotivas de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ou eliminação de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> periférico induzem doenças autoimunes sistêmicas e específicas. No entanto, a reconstituição de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regula a expansão adicional da resposta de células TCD4<sup>+</sup> e evita o desenvolvimento de doenças autoimunes em camundongos *nu/nu*. Posteriormente, definiu-se como característica das Tregs a presença do fator de transcrição *forkhead box P3* (FoxP3) (HORI, 2003), e moléculas de superfície como o CTLA-4 (molécula citotóxica associada a linfócitos T-4)(TAKAHASHI *et al.*, 2000).

As células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> são geradas no timo sendo chamadas de células reguladoras naturais (nTreg). Já as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> reativas a antígenos externos geradas em órgãos linfoides 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 Treg é capaz de diferenciá-las das iTregs (WEISS *et al.*, 2012). As interações entre as células apresentadoras de antígenos (APC) e as células T naïve precedem o desenvolvimento de tolerância e imunidade *in vivo*. Mucida e colaboradores mostraram que a falha no desenvolvimento de iTregs pelo bloqueio da ação de TGF-β comprometem o desenvolvimento da tolerância oral, embora a ausência de nTregs derivados do timo não interfere na indução desse fenômeno (MUCIDA *et al.*, 2005).

Além das células Treg Foxp3<sup>+</sup>, várias subpopulações de linfócitos T com fenótipo regulador induzidas na periferia são importantes na indução de imunossupressão, tais como as Tr1 e as Th3 (WEINER *et al.*, 2011; FARIA; WEINER, 2006b). Esses subtipos de células Treg medeiam sua ação pela secreção das citocinas como IL-10 e TGF-β respectivamente. A produção de citocinas inibitórias (IL-10 e TGF-β) e a citólise de células efetoras por meio da liberação de granzima e perforina tem sido propostas como mecanismos importantes utilizados pelas células iTreg para mediar a supressão da resposta imune inflamatória (CAO *et al.*, 2007).



Embora as iTregs sejam consideradas células diferenciadas estas tem mostrado apresentar certa plasticidade funcional, podendo adquirir expressão de fatores de transcrição (Tbet, Gata 3 e ROR $\gamma$ t) que definem outros subconjuntos de células T auxiliares até então suprimidos. As células TCD4<sup>+</sup> auxiliares do tipo 1 (Th1) produzem interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), além de IL-2 e TNF $\beta$ . Estas células medeiam as respostas de hipersensibilidade do tipo tardio e fornecem proteção contra patógenos intracelulares e vírus (SZABO *et al.*, 2000). As células Th1 preferencialmente expressam genes que incluem cadeia  $\beta$ 2 receptor da IL-12, o receptor IL-18, o CCR5 e o receptor da quimiocina CXCR3 (KOCH *et al.*, 2009). As células T-bet<sup>+</sup>Treg expressão o receptor de quimiocina CXCR3 e acumularam-se em locais de inflamação mediada por células Th1, o que resulta em uma função sobreposta com propriedades homeostáticas e migratórias únicas otimizadas para a supressão de respostas Th1 (KOCH *et al.*, 2009). Di Giovangiulio e colaboradores (2019) mostraram que indivíduos com colite ulcerativa e doença de Crohn na fase ativa apresentaram aumento da frequência de células Treg que expressão IFN $\gamma$  em aproximadamente, quando comparados a indivíduos que na fase inativa. Além disso, a expressão de IFN $\gamma$  foi exclusiva de células Tbet<sup>+</sup>Tregs (DI GIOVANGIULIO *et al.*, 2019). Assim, células reguladores Foxp3<sup>+</sup> que expressão Tbet podem manter a capacidade supressiva, e em certas condições podem adquirir um fenótipo Th1 caracterizado pela secreção de IFN $\gamma$  e de citocinas pró-inflamatórias (KOCH *et al.*, 2012).

Já o fator de transcrição GATA3 é importante para induzir células Th2, e pode agir não somente por meio da indução de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, mas também na inibição de células Th1 específicas (ZHU *et al.*, 2006). A expressão de GATA3 está altamente correlacionada com o receptor de IL-33, ST2, Anfíregulina (AREG) e o receptor de quimiocina CCR4. Este último pode promover o recrutamento seletivo de Tregs GATA3<sup>+</sup> para o local da inflamação ou a expressão de GATA3<sup>+</sup> em células Treg (SAKAI *et al.*, 2021). A expressão intrínseca de GATA3 por Tregs favorece a capacidade de recrutamento para o local da inflamação e a manutenção de altos níveis de expressão de Foxp3 (WOHLFERT *et al.*, 2011). Wohlfert e colaboradores mostraram que *in vitro* que na ausência de mediadores inflamatórios, GATA3 foi induzido em células Tregs em camundongos e humanos após a estimulação do TCR. Além disso, GATA3 é expresso principalmente em células Tregs que residem em tecidos que exibem inflamação de baixo nível, controla a polarização efetora excessiva por Tregs e sua capacidade de se acumular nos tecidos durante a inflamação (WOHLFERT *et al.*, 2011). Em animais com células

Tregs deficientes em GATA3, ocorre acúmulo de células no trato gastrointestinal, com aumento principalmente de células  $ROR\gamma^+$ , em comparação com as células Tregs, e houve secreção de altos níveis da citocina efetora IL-17A (WOHLFERT *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2006).

O fator de transcrição que também pode ser expresso em células  $Foxp3^+$  é o receptor órfão relacionado ao receptor de ácido retinóico gama t ( $ROR\gamma$ ) presente principalmente em células Th17 e nas ILC3s. A combinação de sinais derivados de citocinas e fatores de transcrição regulam a geração de células Treg que expressam  $ROR\gamma$ . A expressão de  $ROR\gamma$  foi inicialmente descrita em células Th17 pela sinalização conjunta de TGF- $\beta$  e IL-6 ou IL-21 dependente da sinalização por STAT3 (ZHOU *et al.*, 2007). No entanto, a expressão de  $ROR\gamma$  foi observada também em células Treg  $Foxp3^+$  que produzem IL-10 e não requerem a presença de IL-6 para a sua diferenciação (LOCHNER *et al.*, 2008). Células  $Foxp3^+ROR\gamma^+T\alpha\beta$  expressa IL-10 e CCL20, e funcionam como células T reguladoras. Além disso, a proporção de  $Foxp3^+$  para células  $ROR\gamma^+T\alpha\beta$  produtoras de IL-17 permanece notavelmente constante em camundongos que sofrem infecção e inflamação (OHNMACHT *et al.*, 2015). O equilíbrio entre as células  $ROR\gamma$  supressoras e inflamatórias (Th17) que é direcionado para uma maior diferenciação das células Treg  $ROR\gamma^+$  é crítico para a homeostase intestinal e a quebra desse equilíbrio resulta na diferenciação das células Th17 patogênicas (XU *et al.*, 2018).

Mucida e colaboradores mostraram que o AR atua opondo-se ao desenvolvimento de células Th17 *in vitro* e *in vivo*, por meio da redução da expressão de  $ROR\gamma$ . A diferenciação de células T *naïve* em células Th17 por células dendríticas (CD) dos mLN está reduzida na presença de ácido retinóico (AR). Em cultura, células TCD4 na presença de citocinas inflamatórias e na ausência de AR, o TGF- $\beta$  induziu níveis elevados de  $ROR\gamma$ , no entanto quando o AR foi adicionado a expressão foi reduzida. Além disso, enquanto as células Treg geradas *in vitro* na presença de TGF- $\beta$  sozinho perderam a expressão de  $Foxp3$  após a reestimulação, no entanto quando a diferenciação de TCD4 ocorreu quando além do TGF- $\beta$  foi adicionado AR. Da maioria das células T  $Foxp3^+$  permaneceram  $Foxp3^+$  após a reestimulação, indicando que RA conduz a diferenciação de a linhagem de células Treg estável (MUCIDA *et al.*, 2007). A geração de células Th17 ou células  $Foxp3^+$  Tregs dependente de TGF- $\beta$  pode fornecer um mecanismo de autocorreção para regular a imunidade pró e anti-inflamatória (MUCIDA *et al.*, 2007).

Essa capacidade regulatória tem particular relevância para o intestino, onde a proteção imune eficiente deve coincidir com a manutenção da integridade da barreira mucosa.

Muitas células imunes produzem TGF- $\beta$  (predominantemente a isoforma de TGF- $\beta$ 1), como macrófagos, linfócitos 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- $\beta$  (ANNES, 2003). Existe uma população de células reguladoras TCD4<sup>+</sup> que expressam em sua superfície o LAP após a ativação, e secretam TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10. Estas células foram identificadas como células supressoras em estudos de modelos murinos de inflamação intestinal e denominadas Th3 (OIDA *et al.*, 2003) e elas também têm sido descritas como importantes mediadoras dos mecanismos inibitórias da tolerância oral em modelos murinos de esclerose múltipla (REZENDE *et al.*, 2013) e artrite reumatoide (GUSMAO-SILVA *et al.*, 2020). 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, TGF- $\beta$  é importante para a indução da expressão de LAP na superfície de células TCD4<sup>+</sup> 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 (FARIA, ANA M C *et al.*, 2003). Em linfócitos B, essa citocina pode atuar na troca de isotipo de imunoglobulinas para IgA. Ela parece ser fundamental na homeostase do intestino e de todo o corpo já que camundongos geneticamente deficientes em TGF- $\beta$ 1 morrem logo após o nascimento devido à doença inflamatória generalizada (SHULL *et al.*, 1992). A produção aumentada de TGF- $\beta$ 1 foi detectada em diversos estudos sobre tolerância oral, o que indica sua importância no desenvolvimento desse fenômeno (FARIA, A. M. C.; WEINER, 2006b).

Estudos anteriores mostram que diferentes linfonodos drenam diferentes segmentos do intestino (HOUSTON *et al.*, 2016). Esterhazy e colaboradores avaliaram a funcionalidade e a assinatura genética dos linfonodos que drenam o intestino (LNMs) de forma compartimentalizada. Assim, foi observado que a redução da frequência de células TCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ocorre dos linfonodos proximais para os distais (dos linfonodos mesentéricos duodenais para os do cólon). Já, as células Th17 e as iTreg ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> apresentaram um crescimento proximal-distal nos LNMs em condições de homeostase.

Além disso, ao administrar uma injeção com antígenos proteicos diretamente no íleo, observou-se uma maior diferenciação de células Th17 e iTreg ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> nesse local, quando comparado a injeção do mesmo estímulo no duodeno. Assim, o estudo mostrou que os linfonodos que drenam o duodeno são locais importantes para a indução de células iTreg por antígenos orais, e já os linfonodos que drenam o íleo favorecem a diferenciação de células TH17 e ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> iTreg (ESTERHÁZY, DARIA; CANESSO; MESIN; MULLER; CASTRO; *et al.*, 2019).

Além das Tregs, outras células imunes que são fundamentais para a indução de TO são as células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo DCs e macrófagos. Dependendo dos marcadores que essas células expressam, elas se tornam críticas na diferenciação de células de iTreg (COOMBES *et al.*, 2007). No intestino, células dendríticas convencionais (cDC) e macrófagos são encontrados no LP intestinal. As populações de cDC são heterogêneas e o fenótipo está relacionado ao microambiente. A maioria do subconjunto cDC são CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>, sendo que todas expressam o FTZbtb46 e são dependentes de FLT3L para o seu desenvolvimento (JOERIS *et al.*, 2017). Estudos anteriores demonstraram que as cDCs presente na LP requerem o receptor 7 de quimiocina (CCR7) para migrar para LNMs. É nesses linfonodos que ocorrem os eventos que conduzem às consequências sistêmicas da tolerância (JANG *et al.*, 2006; WORBS *et al.*, 2006). Depois de adquirir o antígeno, as cDCs migram por meio de vasos linfáticos aferentes para os LNMs. O comprometimento da migração celular entre a mucosa intestinal e os LNMs foi associado a falha na indução de tolerância oral. Lesões nos vasos linfáticos causadas por infecções também interferem na migração das células dendríticas CD103<sup>+</sup> da mucosa para os linfonodos comprometendo a geração de tolerância oral (FONSECA *et al.*, 2015).

Os macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> presentes na LP transferem os antígenos para as DCs CD103<sup>+</sup> através da molécula connexin-43 (junção gap - Cx43). Em situações de deleção genética da Cx43, ocorre falha na indução de TO (MAZZINI *et al.*, 2014). Somadas as funções de apresentação de antígenos, os macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> são importantes para estabelecer tolerância aos antígenos da dieta e da microbiota (KIM *et al.*, 2018). Macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> também expressam CD11b<sup>+</sup> que favorece a proliferação de células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> que se estabelecem na LP (HADIS *et al.*, 2011). A transferência de macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> para camundongos deficientes em CX3CR1 é capaz de inibir o desenvolvimento de colite e a translocação bacteriana (GEEM *et al.*, 2014). Outro aspecto

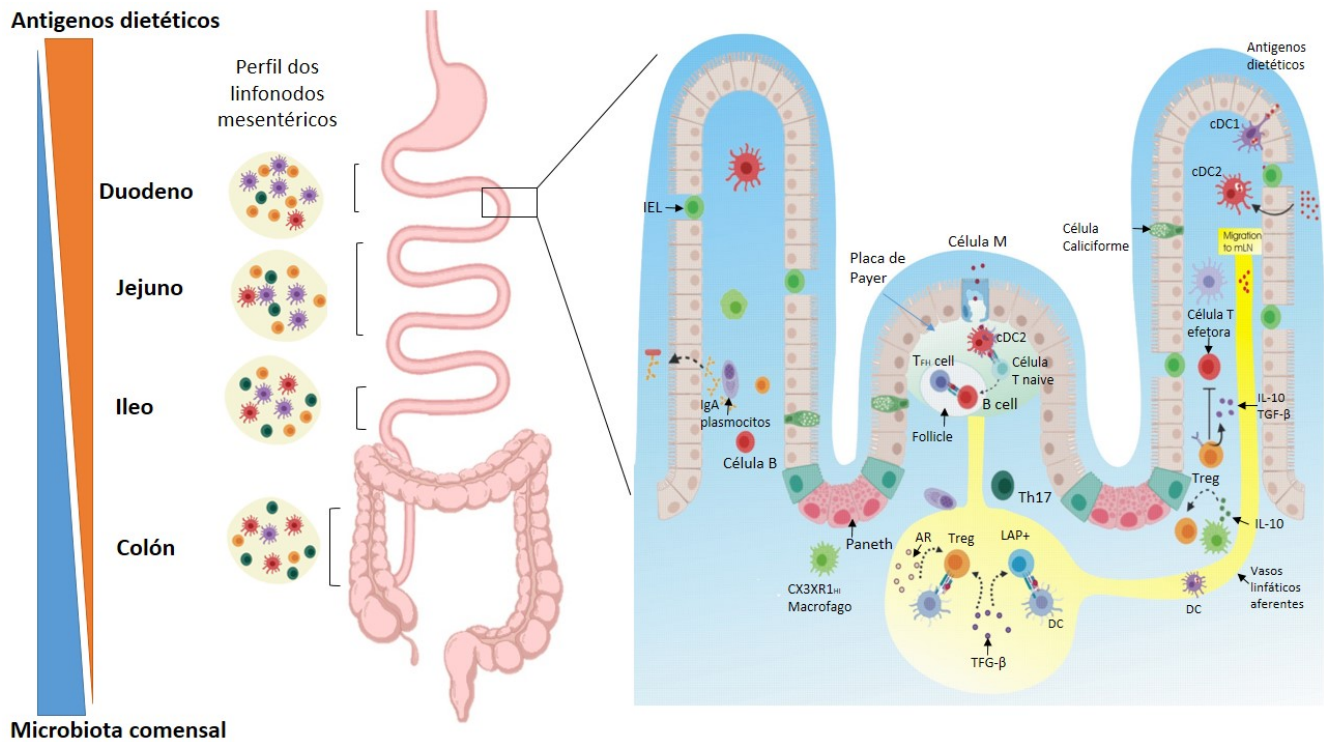
importante das células CX3CR1<sup>+</sup> é sua atuação na manutenção de iTregs na LP mediada pela secreção da citocina IL-10. O bloqueio da produção de IL-10 por macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> resulta em um aumento de células T efetoras específicas para patógenos produtoras IFN- $\gamma$  e inibe a indução de células T CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> específicas para antígenos administrados por via oral (KIM *et al.*, 2018).

A participação das DCs CD103<sup>+</sup> na geração de Tregs intestinais tem sido atribuída à sua capacidade de metabolizar o ácido retinóico (AR) na presença de TGF- $\beta$  (MUCIDA *et al.*, 2007; AGACE; PERSSON, 2012). O AR apresenta efeito imuno-regulador e é produzido por meio de oxidação enzimática, pela enzima retinaldeído desidrogenase 2, codificada pelo gene *Aldh1a2*, que é expresso pela população de DCs envolvida na indução de Treg. Na LP e nos LNMs, as DCs CD103<sup>+</sup> expressam quantidades mais elevadas de RNAm de *Aldh1a2* que, por sua vez, exibem atividade aumentada de aldeído desidrogenase (ALDH) induzindo a metabolização de AR (HILL *et al.*, 2008; SCOTT *et al.*, 2015; PRESCOTT *et al.*, 2020). Além disso, as DCs dos LNMs na presença de AR e de TGF- $\beta$  são capazes de aumentar a expressão dos receptores de quimiocina CCR9 e da integrina  $\alpha 4\beta 7$  promovendo a migração dessas células para as mucosas. Essa combinação de mediadores também suprime a diferenciação de células Th17 dependente de TGF- $\beta$  (MOWAT, 2018; HILL *et al.*, 2008b; MATTEOLI *et al.*, 2010).

Estudos anteriores mostraram que CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> na mucosa são derivadas de monócitos e expressam CCR2 que favorecem a geração de uma resposta Th17 (SCOTT *et al.*, 2015). As DCs presentes no LNMs proximais do intestino delgado possuem respostas preferencialmente tolerogênicas, quando comparadas com as DCs mais abundantes nos LN distais. Nos LNMs duodenais as DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> apresentaram uma assinatura mais anti-inflamatória com níveis mais baixos de receptores de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , e as DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC do LNM duodenal possuem alta concentração de CCL22 e fator *Aldh1a2*, que codifica a enzima para a produção de AR a partir do retinol. Assim, a população de cDCs dos LNMs proximais (duodenal e jejunal) possuem assinatura metabólica e imunológica mais tolerogênicos do que aquelas presentes nos distais (ESTERHÁZY, DARIA; CANESSO; MESIN; MULLER; CASTRO; *et al.*, 2019).

A soma dos mecanismos envolvidos na indução de tolerância oral mostra que apesar de ser um evento fisiológico, o desenvolvimento desse fenômeno requer uma estreita sintonia entre os agentes envolvidos, e que a quebra da homeostase do organismo

pode levar a defeitos nesse evento e comprometer a saúde do indivíduo por favorecer o aparecimento de doenças como alergia alimentar e inflamação intestinal. Os mecanismos indutores de tolerância oral estão resumidos na Figura 1.



**Figura 1- Mecanismo de desenvolvimento da tolerância oral:** O contato com proteínas da dieta reduz ao longo do intestino de forma proximal para distal, já o contrário acontece com a microbiota intestinal que é mais frequente na região distal. Outro aspecto importante é a característica de regionalização dos LNM. Cada linfonodo drena um segmento do intestino e estes por sua vez são imunologicamente distintos e adaptados à região que drenam. Os linfonodos que drenam o duodeno e jejuno apresentam altas frequências de células T reguladoras  $\text{Foxp3}^+$  e de cDCs tolerogênicas quando comparados aos linfonodos distais. As cDCs derivadas da LP e dos linfonodos proximais produzem grandes quantidades de ácido retinóico,  $\text{TGF-}\beta$  e apresentam uma alta expressão de *Aldh1a2*, essas características conferem uma característica mais tolerogênica. Ao contrário, os linfonodos que drenam os segmentos mais distais apresentam uma maior frequência de células  $\text{Roryt}^+$  e  $\text{Th17}$  caracterizando um perfil mais imunogênico. Ao entrar em contato com o antígeno as células DC migram da LP para os linfonodos mesentéricos por meio de vasos eferentes e apresentam este para uma célula T naive. A produção de RA pelos DCs durante a interação com as células T na presença de  $\text{TGF-}\beta$  induz a expressão de  $\text{CCR9}$  e  $\alpha 4\beta 7$ , direcionando para uma diferenciação da célula T naive em uma célula Treg induzida  $\text{Foxp3}^+$ , enquanto suprime a diferenciação de células  $\text{Th17}$  dependentes de  $\text{TGF-}\beta$ . A captação de antígeno ocorre por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo o transporte dos antígenos através das células M nas PP, por DCs que capturam antígenos associados a células caliciformes, indiretamente por meio de células epiteliais de vilosidades ou por transferência de macrófagos  $\text{CX3CR1}^+$  que captam antígenos luminiais. As células dendríticas  $\text{CCR7}^+\text{CD103}^+$  DCs são mais

eficientes do que macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> na indução de Tregs e tolerância. A produção de IL-10 por macrófagos CX3CR1<sup>hi</sup> residentes contribui para expandir células FOXP3<sup>+</sup> na LP. Já a SIgA produzida por plasmócitos e presente no muco bloqueiam a adesão de bactérias comensais e patógenos ao epitélio intestinal; também neutraliza toxinas e lipopolissacarídeos bacterianos que penetram nas células epiteliais.

### **As repercussões da obesidade na mucosa intestinal**

Como descrito anteriormente, a obesidade é uma doença complexa que envolve várias causas, principalmente o excesso de consumo alimentar. Dessa forma, há um envolvimento direto da obesidade com a mucosa intestinal, com impactos negativos ao sistema imune associado à mucosa do intestino.

Na literatura, há evidências sobre as várias maneiras pelas quais a obesidade e a resistência à insulina podem afetar as respostas imunes e a fisiologia intestinal. A obesidade aumenta a inflamação jejunal e aumenta a densidade das populações de macrófagos, células T CD3<sup>+</sup>, linfócitos intraepiteliais e DCs na mucosa do intestino. Também induz ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), quimiocinas e fatores co-estimuladores em células da lâmina própria e compartimento epitelial. O aumento nas populações de células T na mucosa intestinal de indivíduos obesos também está associado a uma resposta à insulina prejudicada em comparação com indivíduos magros (Monteiro-Sepulveda et al., 2015). Em humanos com obesidade e resistência à insulina, ocorre aumento do perfil inflamatório no duodeno em comparação com pacientes não obesos, com mais citocinas inflamatórias e macrófagos M1 (Ho-Plagaro et al., 2019). Além disso, a obesidade foi associada ao aumento da permeabilidade intestinal, demonstrada pelo aumento das concentrações séricas de zonulina, juntamente com modificações da microbiota (Mörkl et al., 2018). O aumento da permeabilidade intestinal também foi relatado em indivíduos com altos níveis de glicemia de jejum, bem como níveis mais elevados de marcadores pró-oxidativos no sangue em comparação com indivíduos saudáveis (Carnevale et al., 2017). Além disso, verificou-se que a permeabilidade intestinal é aumentada por uma dieta rica em gordura (HFD), provavelmente mediada por uma redução na expressão de ZO-1 e occludina, que então favorece a translocação de LPS (Cani et al., 2008b).

Luck e colaboradores (2015) também investigaram os efeitos da obesidade induzida por dieta na imunidade intestinal e mostraram que após 12 a 16 semanas de consumo de dieta hipercalórica, ocorrem 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- $\gamma$  e de células TCD8<sup>+</sup>. Além de redução na proporção de células Tregs CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> quando comparados ao intestino de camundongos magros (LUCK *et al.*, 2015). Ao considerar a frequência de células Tbet<sup>+</sup>(Th1), células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg) e células TCD8<sup>+</sup> na LP do cólon e do íleo de humanos obesos, foi possível observar resultados semelhantes aos encontrados em camundongos (WINER *et al.*, 2016).

A hiperglicemia associada a obesidade, também pode ser considerada como uma outra causa das alterações do sistema imune associado a mucosa, ou mesmo como um agravante das alterações decorrentes da obesidade. Camundongos com hiperglicemia decorrente de obesidade apresentam uma correlação positiva com o aumento das concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-17 no intestino e com aumento da permeabilidade intestinal, somados a redução da frequência de células regulatórias (Luck et al., 2015). Thais e colaboradores mostraram que na ausência de excesso de peso, a presença da hiperglicemia em camundongos tratados estreptozotocina e/ou *db/db* com ingestão controlada de alimentos, levou ao aumento da permeabilidade intestinal e aumento expressão de PRP (padrões de reconhecimento de patógenos) (Thaiss et al., 2018). Assim, parece que a hiperglicemia secundária à obesidade ou sem excesso de peso, a resistência à insulina ou mesmo a diabetes tipo 1 são capazes de resultar em alterações importantes na homeostase intestinal.

Outro ponto importante determinado pela dieta é a microbiota intestinal. A dieta é um dos principais fatores determinantes da composição da microbiota, ela modula a abundância de várias espécies e, conseqüentemente, suas funções individuais ou coletivas. Em condições de obesidade ocorre alterações das proporções de filos bacterianos na microbiota intestinal com aumento de *Firmicutes* e declínio de *Bacteroidetes*, estas alterações em humanos foram relacionadas a doenças inflamatórias intestinais (Turnbaugh et al., 2006).

Em camundongos o consumo de uma dieta rica em lipídios pode levar a alterações na diversidade da microbiota intestinal e na permeabilidade intestinal. O grupo Burcelin (2008, 2011) descreveu que já após uma semana de consumo de dieta hiperlipídica, mudanças foram observadas na mucosa intestinal e na microbiota, como translocação bacteriana, alterações na frequência de células imunes em órgãos linfóides e redução na expressão de zonulina no intestino (Cani et al., 2006; Amar et al., 2011).



Além da influência dietética estudos vem descrevendo estratégias que podem alterar a abundância e a diversidade da microbiota intestinal. Backhed e colaboradores, avaliaram o efeito da microbiota no ganho de peso por meio de transplante da microbiota intestinal de camundongos convencionais para animais *germ-free*. Após o transplante fecal, os animais receptores apresentaram aumento da gordura corporal sem qualquer aumento no consumo dietético, levantando a possibilidade de que a composição da comunidade microbiana no intestino afete a quantidade de energia extraída da dieta (BÄCKHED *et al.*, 2004). Em outro estudo (TURNBAUGH *et al.*, 2006b) foi mostrado que camundongos *germ-free* que receberam dieta hipercalórica foram resistentes ao ganho de peso corporal, ao desenvolvimento de massa gorda e apresentaram glicemia e insulinemia mais baixas quando comparado ao animal convencional com microbiota. Outros estudos também identificaram o envolvimento da microbiota intestinal com o controle do peso corporal e a com homeostase energética (TURNBAUGH *et al.*, 2006a; ZENG *et al.*, 2016).

A relação entre as alterações da microbiota e a permeabilidade intestinal também apresentam correlação com a resistência à insulina. Especificamente, alterações na abundância da microbiota intestinal causadas por níveis cronicamente elevados de glicose e obesidade são conhecidas por resultar em disfunção na barreira intestinal (Guerville *et al.*, 2017). Uma das principais consequências das alterações inflamatórias e a quebra da integridade do epitélio intestinal é o extravasamento de produtos bacterianos, incluindo endotoxinas, como LPS. Isso resulta em disfunção de órgãos imunes, distribuição inadequada de populações de leucócitos e alterações na atividade de linfócitos, que pode afetar a resposta imune contra patógenos, a regulação da resposta imune aos antígenos dietéticos e à microbiota intestinal. Alterações no metabolismo da glicose também podem diminuir tolerância de antígenos da dieta (Miranda *et al.*, 2019).

Além disso, a composição da microbiota intestinal pode ser responsável pelo aumento da endotoxemia em resposta a uma dieta rica em gordura que, por sua vez, desencadearia o desenvolvimento de obesidade e diabetes. Cani e colaboradores mostraram que animais com obesidade induzida por dieta apresentaram alterações na microbiota intestinal, aumento de endotoxemia, inflamação no tecido adiposo e alterações metabólicas como diabetes. Estas alterações foram correlacionadas com o aumento de LPS e com aumento da permeabilidade intestinal. No entanto, após o tratamento oral com antibióticos foi possível observar redução dos níveis plasmáticos de LPS, melhora da

permeabilidade, da inflamação do tecido adiposo visceral, e da hiperglicemia (CANI *et al.*, 2008). Em adição outro estudo mostrou 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 de 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).

Tendo em vista as alterações na mucosa intestinal e na resposta imune associadas à presença de obesidade, nossa hipótese de trabalho foi que as alterações 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 aos antígenos da dieta.

### **A quebra da homeostase intestinal e a alergia alimentar**

A falha na indução da tolerância oral ou a quebra dos mecanismos de tolerância existentes, pode resultar em imunopatologias como doenças inflamatórias intestinais (DII), outros problemas relacionados à fisiologia intestinal, e a alergia alimentar (BELKAID, 2015). Trabalhos anteriores têm demonstrado correlação positiva entre obesidade e sintomas alérgicos, como níveis mais elevados de IgE em crianças e adultos obesos (19,20, 21). Um estudo transversal realizado com 8.856 adultos na China mostraram que indivíduos pré-diabéticos apresentaram correlação positiva entre níveis elevados de glicose e IgE (WANG, H. *et al.*, 2017).

As alergias podem ser definidas como respostas de hipersensibilidade imune a antígenos ambientais comuns chamados alérgenos (GANGWAR *et al.*, 2017). As respostas de hipersensibilidade imediata do tipo 1 (reações alérgicas) desencadeadas por esses alérgenos são geralmente mediadas por células Th2 e imunoglobulina E (IgE). A resposta de sensibilização é caracterizada pela geração de células Th2 e células T foliculares (Tfh) secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13 nos centros germinativos dos linfonodos. A estimulação de células B que mudam de isotipo especificamente para IgE resulta na ligação dessas imunoglobulinas aos receptores específicos FcεR de alta

afinidade na superfície dos mastócitos. Após a sensibilização, as reações alérgicas se desenvolvem em duas fases distintas. Logo após o contato com o alérgeno, a reticulação dos receptores FcεR ligados a IgE leva à degranulação dos mastócitos e liberação de histamina e outras aminas vasoativas que induzem a reação inflamatória da fase inicial (SICHERER; SAMPSON, 2018). No caso da resposta alérgica aos antígenos da dieta, a degranulação dos mastócitos na mucosa intestinal libera mediadores lipídicos, como prostaglandinas e leucotrienos. Além de citocinas e quimiocinas que são fundamentais para estimular o início da fase tardia, caracterizada pelo recrutamento e ativação de células inflamatórias, principalmente eosinófilos e linfócitos Th2, para os locais que foram sensibilizados pelo alérgeno (GOULD; SUTTON, 2008). Na fase tardia, a reação alérgica é caracterizada pela produção de quimiocinas como a eotaxina, aumento da secreção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-9 que promovem o recrutamento, bem como a proliferação de eosinófilos e a formação de uma reação inflamatória celular (MIROTTI et al., 2010).

Os efeitos desses mediadores liberados nos estágios iniciais e tardios são, contrações da musculatura lisa, quimiotaxia de eosinófilos, basófilos e linfócitos Th2, aumento da permeabilidade vascular, produção e secreção de muco, e ativação de linfócitos B. Os sintomas causados por essas reações afetam outros órgãos além do trato gastrointestinal, como a pele (urticária e edema), o trato respiratório (hiper-reatividade e constrição das vias aéreas), o trato cardiovascular (choque anafilático) e o próprio trato gastrointestinal (diarreia, dor e vômito) (RENZ et al., 2018).

O desenvolvimento de alergia alimentar está relacionado a fatores genéticos e ambientais. Mais de 120 genes foram identificados como associados a doenças atópicas. Esses estudos geralmente envolvem ligação genômica e associação de genes, mas nenhum gene de suscetibilidade relevante para doenças alérgicas, como a asma ou a alergia alimentar, foi identificado ainda. Isto indica uma heterogeneidade complexa nas doenças alérgicas e sugere que as influências ambientais que afetam as histonas e a metilação do RNA/DNA podem modificar a transcrição e tradução de genes de susceptibilidade (CAMPBELL et al., 2015).

A alergia alimentar afeta cerca de 5% dos adultos e 8% das crianças em países ocidentalizados (RENZ et al., 2018). A suscetibilidade de crianças ao desenvolvimento de alergia alimentar pode estar relacionada à alta permeabilidade intestinal causada pelo

desenvolvimento imaturo da barreira da mucosa intestinal e ao aumento da exposição a proteínas intactas que podem levar à sensibilização (GROSCHWITZ; HOGAN, 2009).

O desenvolvimento de respostas alérgicas pode iniciar pelo contato no início da vida com produtos microbianos e alimentares ou durante surtos de exposição microbiana (como contato com animais ou ambientes rurais). Moléculas microbianas podem estimular a expressão de genes de receptores Toll-like (TLR) em células apresentadoras que passam a apresentar os antígenos num contexto alergênico (LOSS *et al.*, 2012). Por outro lado, produtos gerados pela microbiota, como o butirato, podem interferir na expressão gênica ao inibir a histona desacetilase (HDAC) e influenciar a expressão do gene FoxP3 em células Treg. Isso sugere que a composição da microbiota intestinal tem efeitos protetores de longo prazo contra alergia alimentar em crianças (AITORO *et al.*, 2017; TAO *et al.*, 2007). No entanto, na obesidade, ocorrem mudanças nas comunidades microbianas intestinais com redução na diversidade bacteriana que está correlacionada com o consumo alimentar e com outros fatores ambientais (LUCK *et al.*, 2015) que podem favorecer o desenvolvimento de alergias.

Apesar do progresso na caracterização do sistema imune associado à mucosa, da tolerância oral e da alergia alimentar, pouco se sabe sobre os efeitos da obesidade nesse sistema. Poucos trabalhos avaliaram as alterações imunes na indução da tolerância oral em camundongos obesos. Mito e colaboradores mostraram uma variação da capacidade de desenvolvimento da tolerância oral a antígenos administradas por via oral, mas não utilizaram protocolos similares aos do nosso grupo (MITO *et al.*, 2006). No entanto, a resposta humoral as Ig específicas ainda precisam ser esclarecidas. Além disso, não estão claros os mecanismos pelos quais a obesidade pode interferir na indução de tolerância oral e porque indivíduos obesos apresentam maior suscetibilidade e/ou gravidade de doenças como alergia alimentar, doenças inflamatórias intestinais e asma.

Assim sendo, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de esclarecer como a obesidade induzida por dieta e a hiperglicemia secundária à obesidade, podem afetar a homeostase da mucosa intestinal e comprometer a indução de tolerância, e assim favorecer a ocorrência de alergia alimentar.

## **OBJETIVO**

### **Objetivo geral**

Avaliar o impacto da obesidade induzida por dieta na homeostase intestinal para verificar se há comprometimento na indução da tolerância oral (TO).

### **Objetivo específicos:**

- Verificar se a obesidade induzida por dieta é capaz de alterar a homeostase intestinal, pela alteração da frequência de algumas populações celulares e pela secreção de IgAS;
- Investigar se a obesidade interfere na capacidade desenvolvimento de tolerância oral, avaliando a resposta imune celular e humoral;
- Avaliar se a obesidade induzida por dieta interfere na frequência de linfócitos T reguladores nos linfonodos mesentéricos após a indução de TO;
- Verificar se a presença ou modulação da microbiota intestinal interfere na indução de TO em camundongos obesos;
- Investigar se a hiperglicemia decorrente ou não da obesidade interfere na de indução de TO;
- Verificar, em humanos, se há correlação entre os níveis séricos de IgE com a obesidade e com a obesidade associada ao diabetes melitus tipo 2 (DM2). Além de verificar se há alterações na mucosa intestinal associadas à obesidade e a obesidade com DM2

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e tratamento dietético**

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados camundongos C57BL/6 machos mantidos no biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com livre acesso à água e alimentação de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG, Brasil, protocolo335/2017) da UFMG. Os camundongos foram alimentados durante 13 semanas com dieta AIN93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR., 1993) ou dieta experimental contendo alto teor de lipídeos (manteiga) e de carboidrato simples (sacarose) testada previamente em nosso laboratório (High Sugar Butter (HSB)) (MAIOLI, T.U. *et al.*, 2016), de forma que simulasse uma dieta hipercalórica consumida por humanos (Tabela 1). A ingestão alimentar foi medida semanalmente no mesmo dia e horário durante todo o período do experimento por meio da diferença entre a dieta ofertada e o resto ingestão.

### **Avaliação do peso corporal**

Ao longo das 13 semanas o peso corporal dos animais foi aferido no mesmo dia da semana e horário para reduzir a variabilidade na aferição. A temperatura do biotério foi mantida em aproximadamente 26°C, para proporcionar a manutenção da temperatura corporal dos animais o mais constante possível, de forma a manter a estabilidade do ganho de peso.

### **Índice de adiposidade**

Para avaliar o índice de adiposidade, os camundongos foram pesados no momento da eutanásia depois de anestesiados. Em seguida, retirou-se o tecido adiposo epididimal, e realizou-se a pesagem do tecido. Os dados foram calculados de acordo com a fórmula:

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

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

	<b>AIN93G</b>	<b>HSB</b>
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 <sup>a</sup>	0,04	0,04
<b>Composição Centesimal</b>		
Carboidrato	64	36
Proteínas	20	16
Lipídeos	16	48

<sup>a</sup>A quantidade de proteína por grama de peso foi baseada no peso inicial do camundongo, 25g/camundongo considerando ingestão de 5g de dieta/dia.

### **Teste de Tolerância a Glicose (GTT)**

Para o teste de tolerância oral a glicose, os camundongos ficaram em jejum por 6 horas e posteriormente foram pesados para que a quantidade de glicose fosse definida individualmente. Foi preconizado 2g/kg de peso animal de D-glicose anidra (Synth), administrada por gavagem (WINER, S. *et al.*, 2009). A glicemia foi mensurada em mg/dL com glicosímetro de tiras (Accu-Chek Performa) nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos retirando-se uma gota de sangue da veia da cauda do camundongo.

### **Medida da Permeabilidade intestinal**

O ensaio de permeabilidade intestinal foi realizado após injeção intragástrica de 0,1mL de ácido dietilenotriamina penta-acético (DTPA) marcado com <sup>99m</sup>tecnécio (<sup>99m</sup>Tc). Após 4 horas, o sangue dos animais foi coletado em heparina e disposto em tubos para hemólise. A difusão da radioatividade foi medida em contador gama automatizado (Perkin Elmer. Wallac Wizard 1470–020 Gamma Counter; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EUA). Os resultados obtidos foram comparados com a dose padrão e calculados para porcentagem da dose por grama de sangue, usando a seguinte equação: (VIANA *et al.*, 2010)

*Porcentagem (%) da dose de <sup>99m</sup>Tc-DTPA no sangue = [(cpm do sangue X 100) / cpm da dose (Padrão) administrada].*

cpm = contagem por minuto

### **Análise histopatológica do intestino**

Amostras do intestino dos camundongos coletadas para a realização da análises histológicas no momento da eutanásia. As amostras coletadas foram fixadas 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 álcool, clarificado em xilol e banhado em parafina. Logo os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes de 4µm de espessura foram obtidos em micrótomo automático. Posteriormente, as laminas foram desidratados em diferentes concentrações de álcool, coradas com coloração com hematoxilina (HE), lavadas em água corrente, coradas com eosina e desidratadas novamente para a montagem. As lâminas foram avaliadas e fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico nos aumentos de 10, 20 ou 40X. As imagens foram capturadas com a microcâmera JVC TK-1270/RGB.

### **Contagem de linfócitos intraepiteliais (IEL)**

A contagem dos linfócitos intraepiteliais (IELs) foi realizaa nas lâminas coradas com H.E e examinada em microscópio óptico no aumento de 20X. Os IEL foram identificados pela sua localização e características: 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) (FERGUSON; MURRAY, 1971). O número final de IEL foi expresso em relação a 100 células epiteliais.

### **Medida dos níveis 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 com 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 (0,05%). Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgA de camundongo conjugado com biotina a 0,5mg/mL (Southern Biotechnology) diluído (1:10000) em PBS com 0,25% caseína. Essa solução foi adicionada 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 com 0,25% caseína durante uma hora a temperatura ambiente. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-conjugado foi feita pela adição de 4mg de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma) e 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% diluídos em 10mL de tampão citrato 100µl/poço. A reação foi interrompida pela adição de 20µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 com 0,25% caseína. A solução de PBS com 0,25% caseína foi utilizada como controle negativo.

### **Avaliação da frequência de bactérias ligadas à IgA**

As fezes foram coletadas do colón, transferidas para um tubo de plástico estéril, e diluídas em salina tamponada com fosfato estéril (100mg/mL). A solução foi centrifugada por 20min a 4000g a 4°C. O sobrenadante foi coletado, filtrado em *cell strainer* de 70µm e diluído (1:1000). Posteriormente centrifugado a 8000g para precipitado de bactéria. Os *pellets* obtidos foram incubados com ou sem FITC-labeled goat F(ab)<sup>2</sup> anti-mouse IgA por 20min. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACSCan™). A análise foi feita utilizando o software FlowJo e a estratégia está demonstrada na Figura 3.

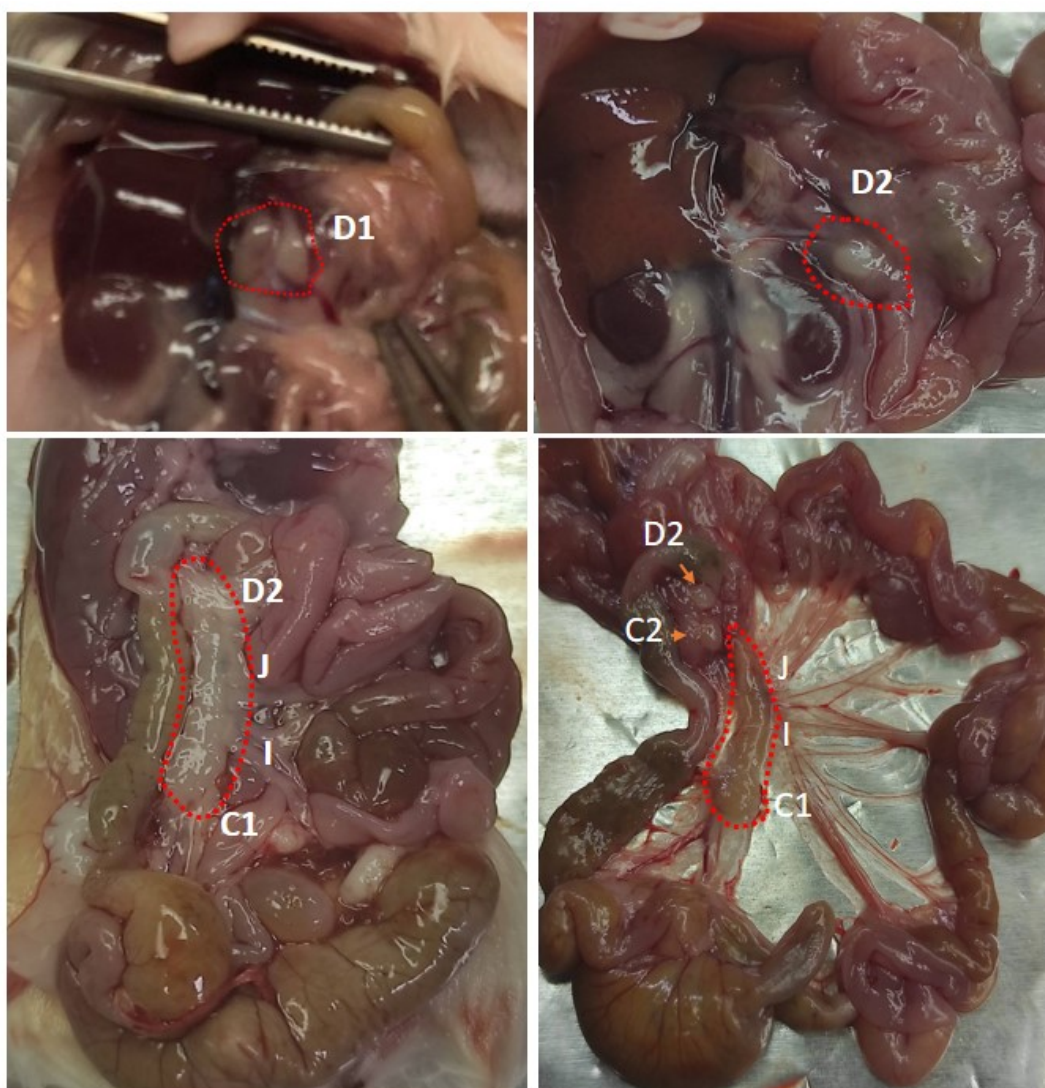
### **Obtenção de IELs**

Para obtenção dos IELs o intestino delgado foi coletado, os linfonodos mesentéricos e as placas de Peyer foram separadas, e as fezes removidas. Posteriormente, o intestino foi cortado longitudinalmente e lavado duas vezes em PBS. O tecido foi cortado em pedaços de 1cm; o muco foi removido incubando o tecido por 10 min em PBS com 1µM de DTT, e o epitélio foi removido após duas incubações em 25ml de HBSS com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 30mM de EDTA por 10min a 37°C com agitação vigorosa a 230RPM. Após cada incubação os fragmentos de tecido foram lavados em PBS. As células foram filtradas em filtro de células de 70µm, em seguida lavadas com RPMI até completar 10mL. A solução de células foi centrifugada por 10min a 1200RPM. As células foram ressuspensas em RPMI e filtradas no *cell strainer* de 40µm, seguida de uma nova centrifugação. Os peletes foram diluídos em RPMI com 40% de Percoll (BD Pharmingen). Em seguida, a solução Percoll 40% foi adicionada cuidadosamente para uma solução Percoll 80%. Esta solução foi centrifugada a 1000g por 25min sem interrupção para formação de gradiente celular. Os leucócitos foram isolados da interfase, depois lavados com RPMI com 2% SFB. Por fim, calculou-se a concentração de células e procedeu-se à marcação com anticorpos específicos para análise por citometria de fluxo.

### **Obtenção de células de órgãos linfoides**

O baço e os linfonodos mesentéricos (Figura 2) 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), 50 $\mu$ M de 2-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech – Uppsala, Suíça) e 20 $\mu$ g/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 500 $\mu$ l de meio completo para os linfonodos mesentéricos. Para a hemólise das hemácias presentes no 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.



**Figura 2: Posição anatômica dos linfonodos mesentéricos em camundongos.** Os linfonodos drenam o intestino de forma compartimentalizada sendo divididos em linfonodos duodenais (D), jejunal (J), ilíaco (I) e colonico (C).

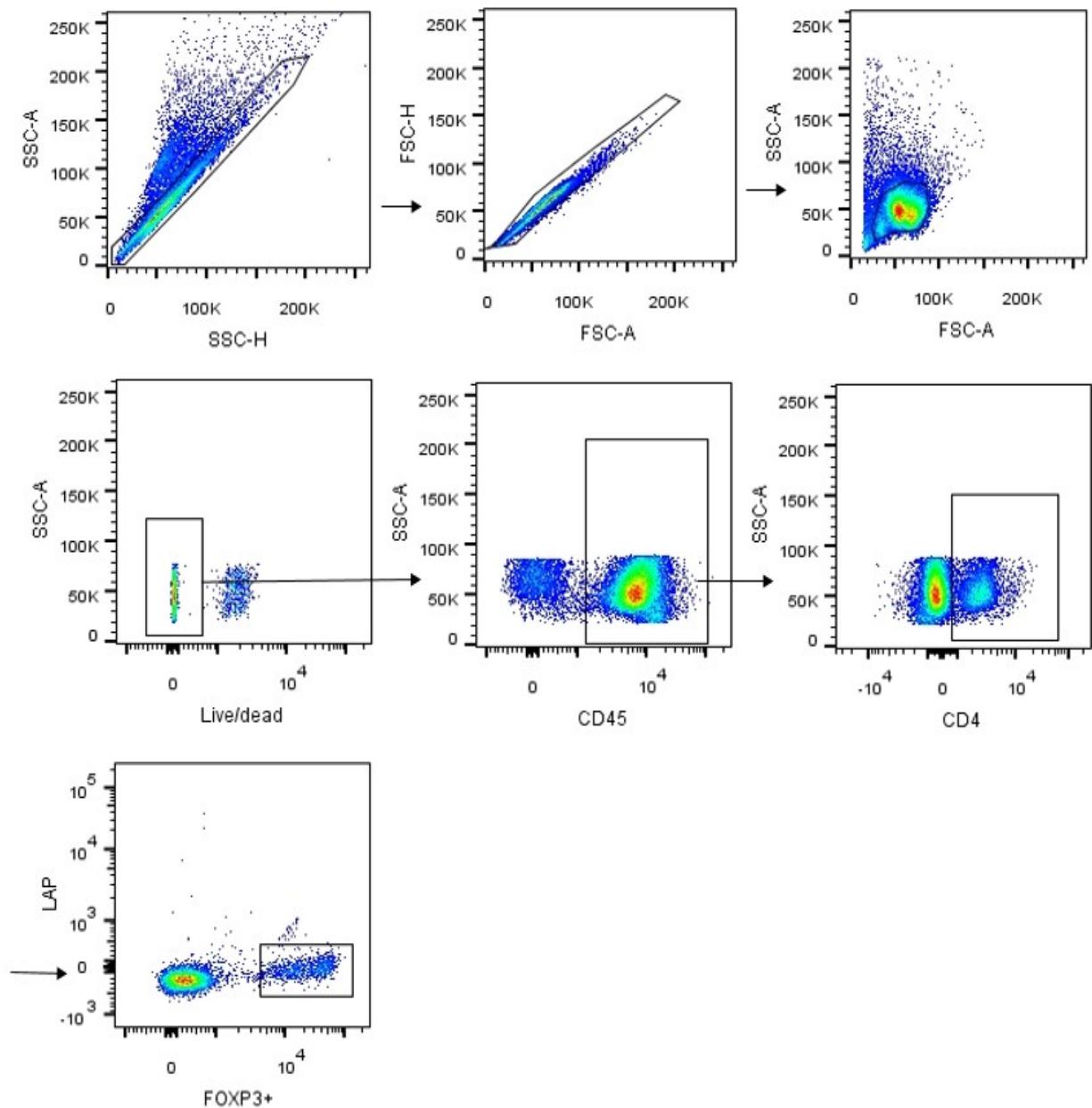
### **Análises por Citometria de Fluxo**

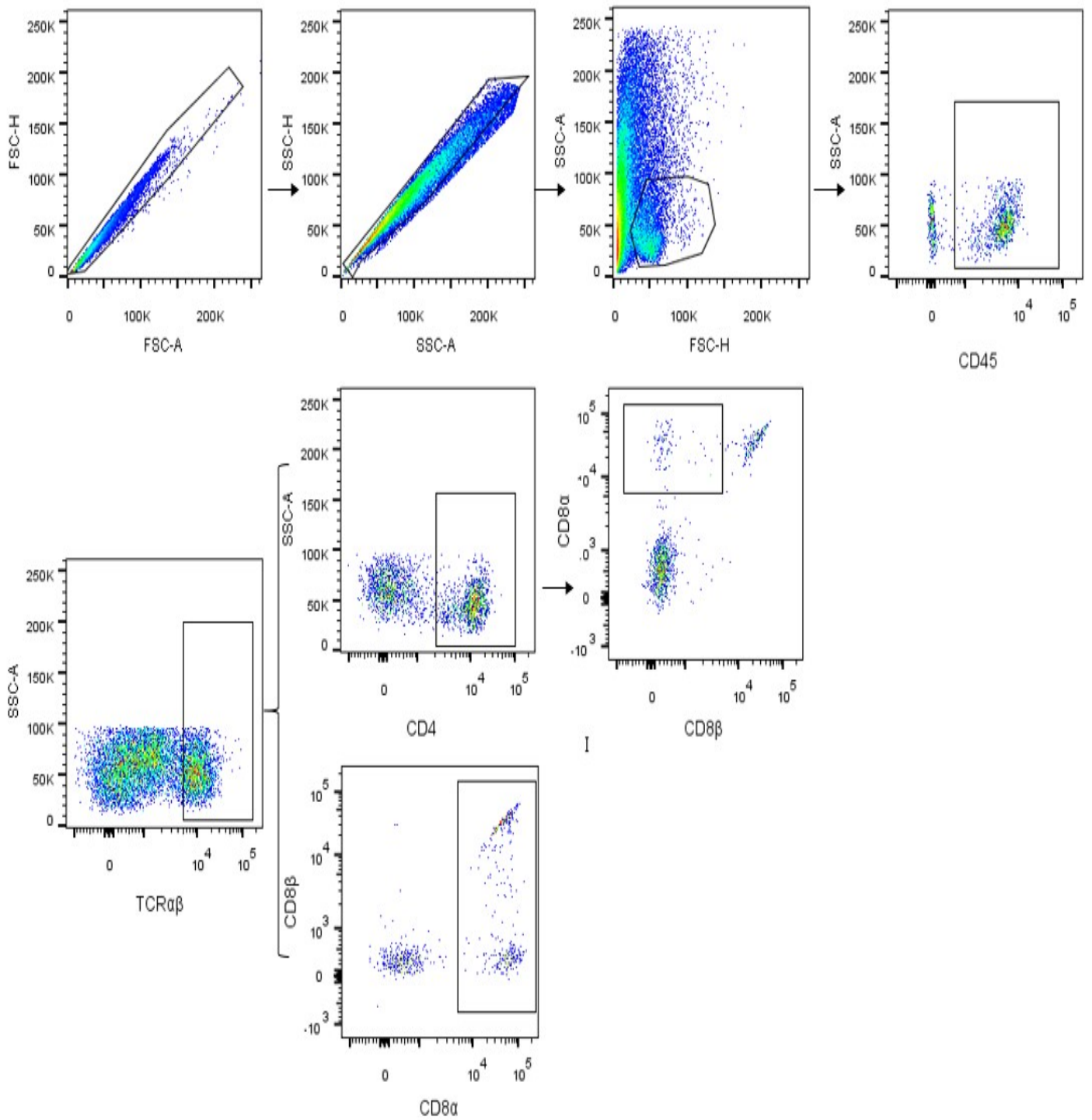
As células extraídas dos LNMs e os IELs do intestino delgado foram avaliadas por citometria de fluxo para identificar os linfócitos T CD4 Foxp3<sup>+</sup> e os linfócitos intraepiteliais (IEL). As células foram incubadas em tubos de polipropileno por 30min a 4°C com mAb anti-CD16/CD32 para bloquear os receptores FcγRII/III, e por mais 30 minutos a 4°C com Live/Dead para segregar as células viáveis. Em seguida, as células foram lavadas e adicionados 20-30μl da mistura de anticorpos conjugados com os fluorocromos e posteriormente incubadas por 40min a 4°C para marcação das moléculas de superfície. Para marcação intracelular do Foxp3, foi utilizado o kit comercial de fixação/permeabilização (e-Bioscience) utilizando o protocolo indicado pelo fabricante. Posteriormente as amostras foram incubadas por mais 30 minutos com os anticorpos específicos conjugados aos fluorocromos. As amostras foram novamente lavadas com PBS-BSA (0,5% BSA), e seguiram para aquisição e análise por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no FACSCantoII ou FACSFortessa (BD Biosciences) acoplado a computadores com software Diva. As populações de interesse foram delimitadas por tamanho e granulosidade (*Forward Scatter* × *Side Scatter*), e 50.000 ou 100.000 eventos foram adquiridos para análise subsequente usando o software FlowJo.

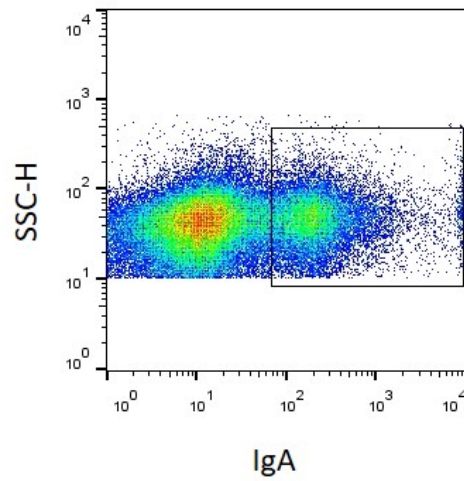
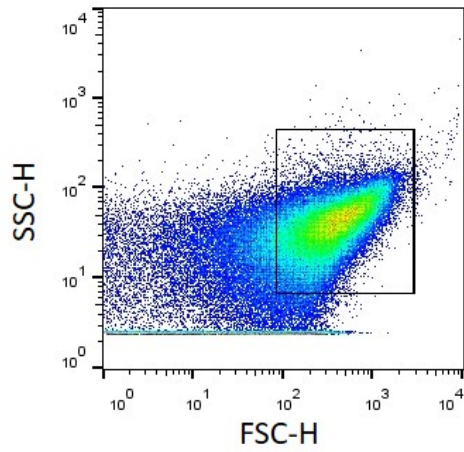
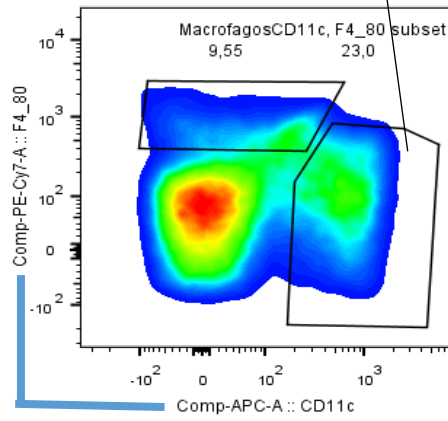
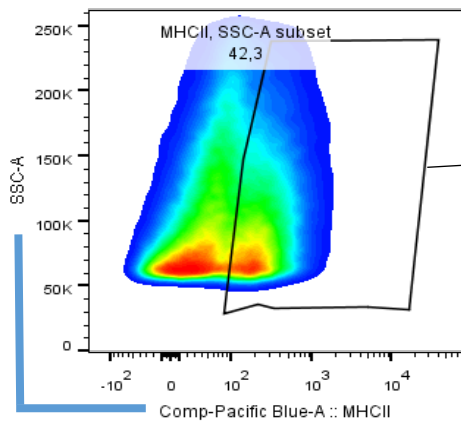
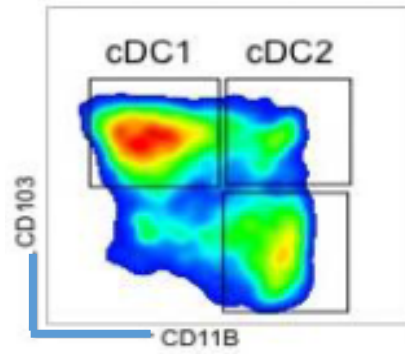
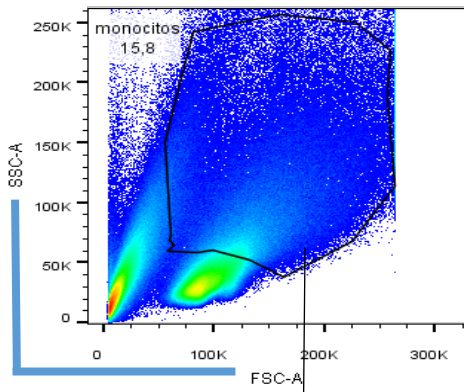
Os anticorpos de fluorescência utilizados foram obtidos das empresas e Bioscience (USA), Biolegend ou B&D: Anti- RORγt, 12- 6988-82, Pe (Q31-378); Anti-mouse CD3, 555276, PE-cy5 (17A2); Anti-mouse CD19, 15-0.193-82 PerCP-Cy 5.5 (eBio1D3 (1D3)). Rat anti- mouse CD11b, 550993; PerCP-Cy 5.5 (M1/70 (RUO)). Mouse anti-GATA 3, 580405, Pe-Cy7 (L50-823); Mouse anti-T-bet, 563318, BV421(O4-46 (RUO)); LIVE/Dead™ Fixable Aqua Stain Kit, L34957; Anti mouse CD11b; 47-0112-82, APC-eFluor 780 (M1/70); Anti mouse MHCII I-Ad, 17-5323-80 APC (AMS-32.1); anti-mouse CD11c, 49-0114-80, e-fluor 450 (N418); anti-mouse CD4, 11-0041-82, FITC (GK1.5); anti mouse FOXP3, 56-573-82 AF700 (FJK-16s); Anti mouse CD8b, 48-0083-80, Efluor 450 (eBioH35-17.2); anti-CD45, 25-0451-82, PE/Cy 7 (30-F11); Anti-mouse T-bet, 644813, APC (4B10); anti-FOXP3, 12-5773-82, Pe (FJK-16s); anti-CD11b, 47- 0112-82, APC (M1/70); anti-mouse CD4, 17-0041-82, APC (GK1.5);

LIVE/Dead<sup>TM</sup> Fixable Aqua Stain Kit, L34957. Anti-mouse CD45 103108, FITC (30-F11); Anti-mouse CD4, 116022, Alexa Fluor 700 (RM4-4); CD103 anti-mouse, 121419, FITC (2E7); anti-CX3CR1, 149006, Pe (SA011F11); F4/80 anti-mouse, 123113, PE/Cy7 (BM8); LAP (TGF- $\beta$ 1) anti-mouse, 141305, Pe (TW7-20B9); Anti-mouse CD4, 116015, PE/Cy7 (RM4-4); anti-mouse TCR $\gamma/\delta$ , 118107, PE (GL3). Anti-mouse TCR  $\beta$ , 109227, PerCP-Cy 5.5 (H57-597); Anti-mouse CD8a, 100712, APC (53-6.7).

As estratégias para determinação das populações de células de interesse estão exemplificadas na Figura 1.







**Figura 3–Estratégias de análise utilizadas para identificar populações de interesse.** As células em suspensão foram marcadas com anticorpos específicos e adquiridas por citometria de fluxo. Foram selecionadas as células viáveis e retirados os *doublets* selecionando-os pelos parâmetros SSC-A e FSC-A. Os linfócitos foram identificados através da seleção de células por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) padrão (gate para linfócitos). Para análise de todas as populações específicas foi utilizado o FMO adequado (fluorescence minus one). Os *dot plots* representam a estratégia utilizada (A) células Tregs nos LNMs; (B) linfócitos intraepiteliais (IELs); (C) células dendríticas; (D) Bactéria ligada a IgA. Para análise das bactérias ligadas a IgA., as bactérias foram selecionadas pelo seu tamanho e pouca granulosidade reduzido utilizando-se os parâmetros de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) como descrito por Palm e colaboradores, (Palm et al. 2014). A população positiva para IgA foi quantificada. Os dot plots representam a estratégia de análise utilizada (D).

### **Cultura de Células**

Após a obtenção da suspensão de células dos LNM e do baço, as células foram plaqueadas ( $1 \times 10^6$  células/well) em placas de 96 poços e incubadas por 48 ou 72 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram estimuladas com OVA (10µg/mL). Ao término do período de incubação o sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise de citocinas.

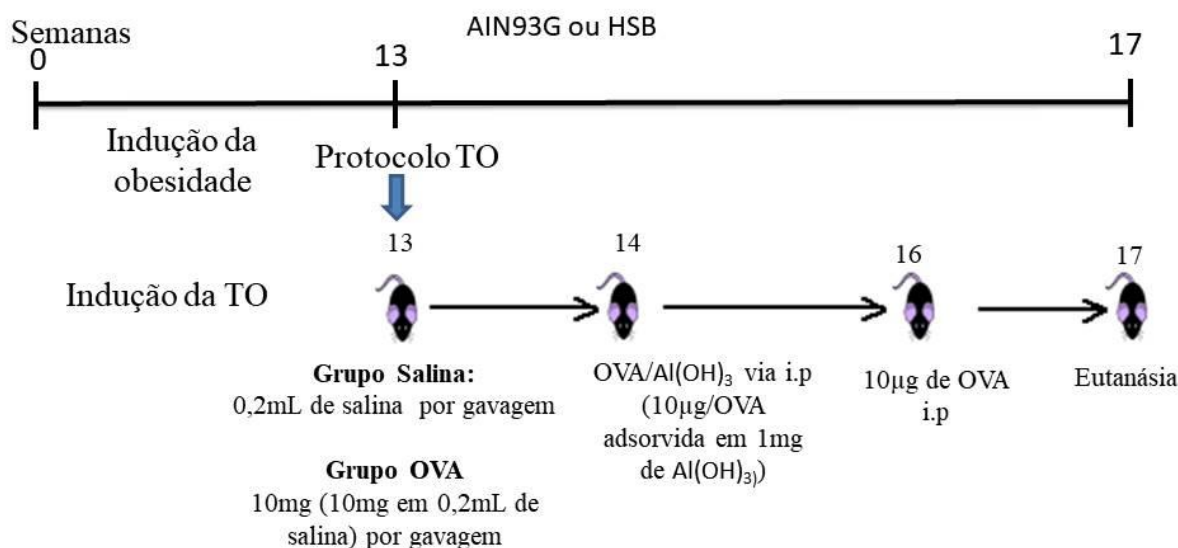
### **Indução da Tolerância Oral**

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 o antígeno (OVA) antes da imunização (Grupo OVA).

Utilizou-se como antígeno Ovalbumina (OVA) cristalizada Grade III (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A administração por via oral foi feita uma única vez por injeção intra-gástrica (gavagem) com 10mg de OVA em 0,2mL de salina com uma agulha de alimentação de animais, inoxidável calibre 18 de ponta redonda. Já o 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)<sub>3</sub>) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) como adjuvante em 0,2mL de salina. Um reforço com 10µg OVA em salina foi administrado



via i.p. 14 dias após a imunização primária, e 7 dias seguidos do reforço os animais foram eutanasiados (Figura 4).



**Figura 4: Delineamento experimental para o estabelecimento de tolerância oral.** Al(OH)<sub>3</sub>- hidróxido de alumínio; i.p. - intraperitoneal; OVA - ovalbumina; TO -Tolerância Oral.

### 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), dose de anestésico sub-letal. Em seguida, o sangue foi coletado por meio de punção cardíaca e centrifugado por 10 minutos, o soro foi separado, coletado e armazenado a -20°C para posteriores análises.

### Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para Medida de Anticorpos

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

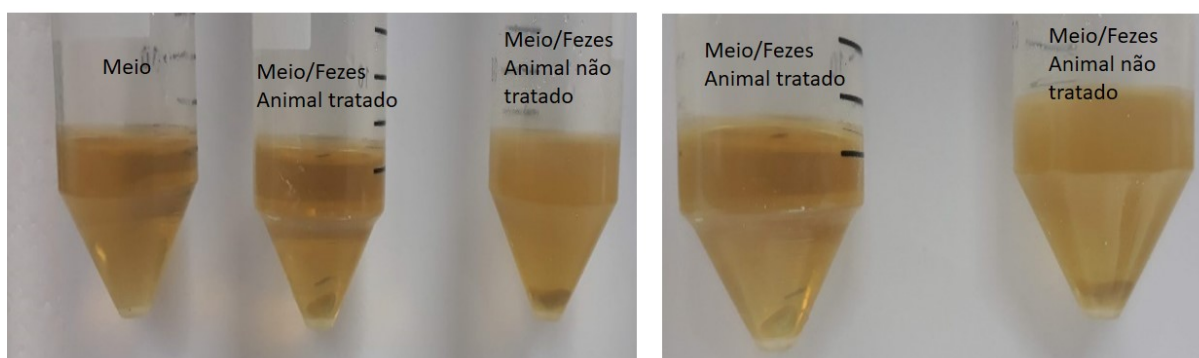
em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Ao término da incubação, as placas foram lavadas novamente três vezes em salina-tween e incubadas por uma hora a 37°C com soro dos camundongos em diluição seriada de 1:500 a 1:36000 em PBS-caseína. Como controle negativo foi utilizado soro de animais 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 de camundongo conjugado à peroxidase (Southern Biotechnology Ass, Inc.) na diluição de 1:10000 por uma hora à 37°C. Ao término 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após término dessa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20µl/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).

### **Ensaio Imunoenzimático (ELISA) 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- $\gamma$  ou TGF- $\beta$  (R&D-Systems® ELISA, Minneapolis, MN/USA) e a placa foi incubada a 4°C 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, citocinas recombinantes com concentração conhecida foram utilizadas como padrão e as placas foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente por cinco vezes e anticorpos monoclonais biotinilados reativos às citocinas foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Foi adicionada estreptavidina conjugada 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato de sódio. A reação foi interrompida pela adição de 20µl/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A absorbância foi medida a 492nm em um leitor de ELISA (BIO-RAD Modelo 450).

### Tratamento com antibióticos

Após 13 semanas de dieta, camundongos C57BL/6 machos foram tratados com antibiótico em uma combinação de ciprofloxacina (0,2g/l, Sigma-Aldrich), metronidazol (1g/l, Sigma- Aldrich) e vancomicina (0,5g/l, Sigma-Aldrich) por gavagem durante 21 dias (SUEZ et al., 2014). Os animais receberam dieta irradiada 10kGy e água autoclavada durante todo o experimento. Ao fim do tratamento, as fezes dos animais foram coletadas e cultivadas em meio tioglicolato a 37°C por 72 horas. Após confirmar a ausência de crescimento de bactérias no meio (Figura 5), iniciou-se o protocolo de indução de tolerância oral.



**Figura 5:** Teste de proliferação bacteriana das fezes de animais tratados com antibiótico. As fezes foram coletadas e armazenadas em tioglicolato por 72 horas a 37°C divididas em grupo tratado, não tratado e meio. N=8.

### Transplante fecal

Para o transplante fecal (FMT), 100mg de fezes foram coletados de camundongos doadores suspensas em 1ml de PBS estéril imediatamente. A transferência fecal foi realizada por gavagem gástrica com 200µL da solução de fezes (THAISS *et al.*, 2016; FUJISAKA *et al.*, 2016) durante 21 dias alternados.

### Indução de alergia alimentar

A alergia alimentar a OVA foi induzida pelo protocolo previamente descrito por (SALDANHA *et al.*, 2004). Os camundongos foram imunizados por via i.p. com 10µg de OVA em 1mg de Al (OH)<sub>3</sub> em 0,2 mL de solução salina. Um reforço com 10µg de

OVA em 0,2mL de solução salina foi administrado 14 dias depois. Após 7 dias do reforço, os animais foram alimentados diariamente com uma solução de OVA a 20% durante sete dias consecutivos. O peso dos camundongos e a ingestão dietética e de líquidos foram medidos diariamente.

### **Ensaio de anafilaxia cutânea passiva**

Os camundongos foram sensibilizados para OVA e desafiados com solução com 20% de clara de ovo na água de beber por 7 dias. Posteriormente os animais receberam uma injeção intradérmica (i.d.) no dorso contendo OVA (20 $\mu$ g) ou PBS, seguido por uma administração intravenosa de corante Azul de Evans (1mg/ml). Após 30min, o experimento foi realizado. A pele foi retirada para visualização da reação que foi determinada pelo extravasamento do corante azul (FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2000).

### **RT-PCR quantitativo**

Amostras de biopsia de jejuno de humanos foram coletadas no momento da cirurgia bariátrica. O RNA de jejuno foi preparado usando o Kit RNeasy Tissue (Qiagen) e o cDNA foi sintetizado usando SuperScript II e hexâmeros aleatórios (Promega). A PCR quantitativa foi desenvolvida com kit SybrGreen e a quantificação relativa de cada transcrição foi feita em comparação com a transcrição da média dos genes 18S e GAPDH determinada pelo método  $2^{-\Delta CT}$ . As sequências de primer para os genes de humanos direcionados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2: Lista de primers específicos utilizados para detecção da expressão dos genes de interesse**

	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>CLAUDIN 1</b>	TGGTGGTTGGCATCCTCCTG	AATTCGTACCTGGCATTGACTGG
<b>CLAUDIN 2</b>	GGCGGTAGCAGGTGGTGGAGTC	CTTGGTAGGCATCGTAGTAGTTGG
<b>FOXP3</b>	5'-GCGCCTCGAGGACCTCAAGATCAAG GAAAGGA-3'	5'-GCGCGAATTCTGAGGGACAGGATTG TGACAT-3'
<b>HP2</b>	5-ATGGCTATGTGGAGCACTCG-3	5- TACAGGGCTCTTCGGTGTCT-3
<b>IL-10</b>	5'- TGT CAT CGA TTT CTT CCC TGT -3'	5'- GGC TTT GTA GAT GCC TTT CYC T-3'
<b>IL-13</b>	GAA GGC TCC GCT CTG CAA T	TCT GGG TCT TCT CGA TGG CA
<b>IL-17</b>		
<b>IL1B</b>	5'ATG GAC AAGCTGAGG AAG ATG-3'	5'-CCC ATG TGT CGA AGA AGA TAG-3'
<b>IL-25</b>	5-CGACCCAGATTAGGTGAGGA	5-TCCATCTTCACTGGCCCTAC
<b>IL-6</b>	5'- GGA GAC TTG CCT GGT GAA A-3'	5'-CTG GCT TGT TCC TCA CTA CTC-3'
<b>IL-9</b>	CTT CCT CAT CAA CAA GAT GCA -G	AGA GAC AC TGG TCA CAT TAG CAC
<b>Myosin IXB</b>	AGGGTACAGCGCCAAGTACA	CTCCTTCAGGAAGACCTTGG
<b>OCCLUDIN</b>	AATTCTTCACTTCTAACAAATGGACCTC	CACATCACAATAATGAGCATAGACAGG
<b>TGF</b>	5'- TTG ATG TCA CCG GAG TTG TG-3'	5'- TCC ACT TGC AGT GTG TTA TCC -3'
<b>TLR4</b>	5'- CCT AAG CCA CCT CTC TAC CTT A- 3'	5'- AGC CAC CAG CTT CTG TAA AC-3'
<b>TNF</b>	5'-AGAGGGAGAGAAGCAACTACA-3'	5'-GGGTCAGTATGTGAGAGGAAGA-3'
<b>ZO-1</b>	CAAGATAGTTTGGCAGCAAGAGATG	ATCAGGGACATTCAATAGCGTAGC
<b>GAPDH</b>	5-GAGTCAACGGATTTGGTCGT	5-TTGATTTTGGAGGGATCTCG
<b>GLUT4</b>	5'- AGC TCT CTG GCA TCA ATG CTG T- 3'	5'- ACA ACA CCG AGA CCA AGG TGA A -3'

**Medida dos níveis séricos de IgE em plasma humano**

O plasma de 60 indivíduos foi utilizado para determinação dos níveis séricos de IgE. A concentração plasmática de IgE foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as recomendações do fabricante (IgE ELISA kits; cat. no. BMS2097).

### **Análises Estatísticas**

Para avaliar a diferença estatística entre as variáveis de camundongo, utilizou-se o teste t de *Student* e ANOVA para as amostras não pareadas e pareadas aceitando-se o nível de significância  $p < 0,05$  utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0. Para as amostras de humanos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e análise de correlação de Spearman. Aceitou-se como nível de significância  $p < 0,05$ .

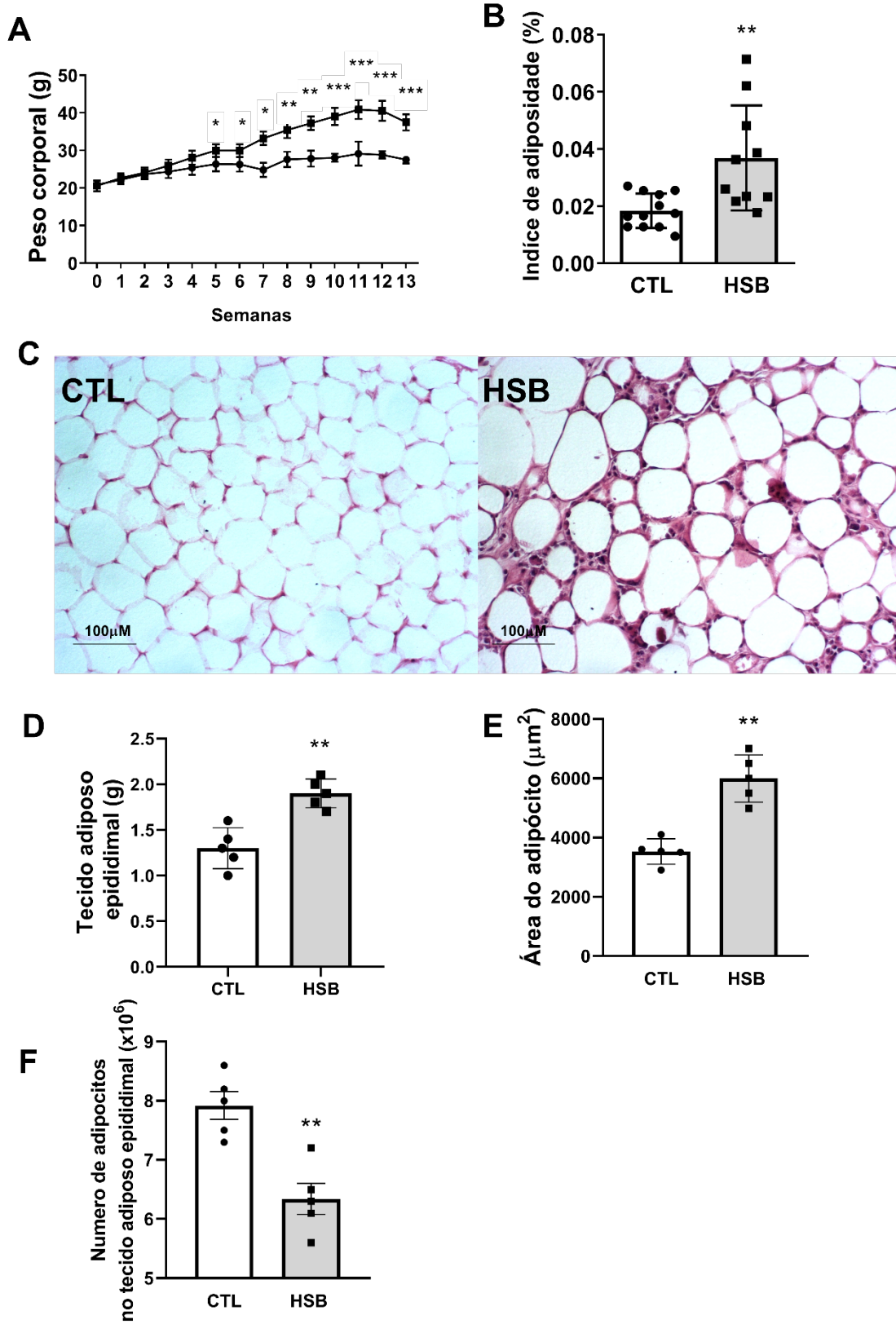
## **3. RESULTADOS**

### **Alterações metabólicas associadas ao consumo da dieta HSB em camundongos**

A obesidade é correlacionada com alterações metabólicas e na homeostase intestinal. Assim, para investigar as alterações metabólicas e imunes associadas a obesidade animais C57BL/6 machos foram tratados com dieta rica em sacarose e lipídios (high sugar butter) - HSB previamente validada pelo nosso grupo. Trata-se de uma dieta modificada cuja base é a AIN93G com acréscimo de sacarose e manteiga, e redução de amido dextrinizado e amido de milho (MAIOLI, 2016). A presença de manteiga e açúcar deixa a dieta mais palatável e se aproxima das concentrações de gordura e alto teor de carboidratos da maioria dos alimentos industrializados geralmente consumidos por humanos (KAU *et al.*, 2011).

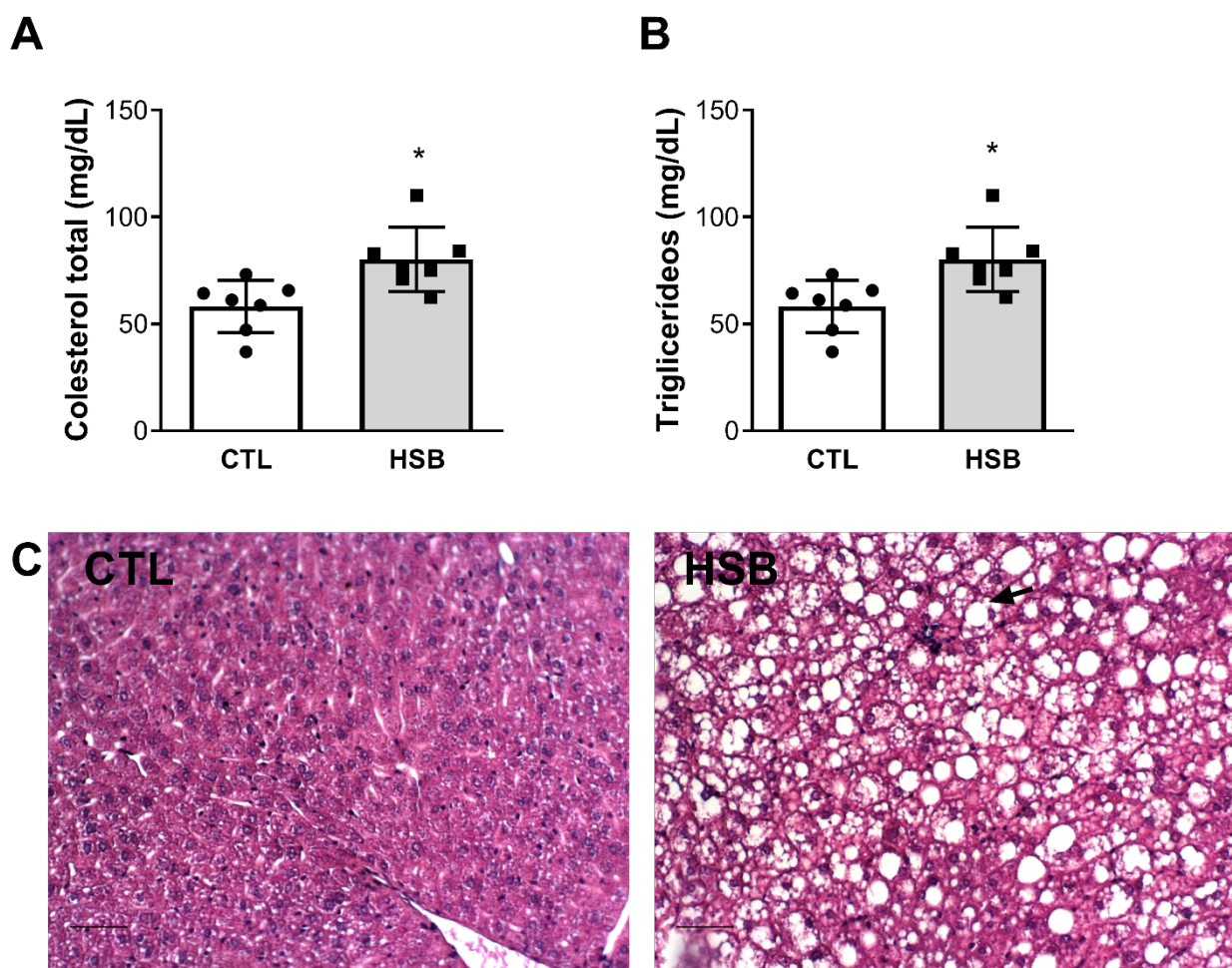
Os camundongos receberam a dieta por 13 semanas. Foi observado que a ingestão de dieta HSB aumentou o peso corporal a partir da quinta semana de consumo da dieta em comparação com camundongos que consumiram a dieta controle AIN93G (Fig. 6A). Em adição aos valores obtidos das análises de peso corporal 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 (Fig.6B). O aumento da adiposidade também pode ser observado pela análise histológica. Como mostrado na Figura 4C, os adipócitos

de camundongos alimentados com HSB apresentaram hipertrofia (aumento do tamanho), maior quantidade de infiltrado celular e uma redução do número de adipócitos (Fig. 6D-F).



**Figura 6: O consumo de dieta HSB induz ganho de peso e hipertrofia do tecido adiposo.** Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 13 semanas com dieta AIN93G (controle - CTL) ou HSB (experimental). Durante esse período, o ganho de peso corporal foi monitorado (A). Ao final desse período, os animais foram sacrificados e o tecido adiposo epididimal foi isolado para avaliação do índice de adiposidade, expresso pelo peso do tecido adiposo epididimal/peso corporal (B) e para análise histológica (C). A esquerda da figura C está o painel que representa o tecido adiposo epididimal de camundongos tratados com dieta AIN93G e o painel à direita de animais tratados com a dieta HSB. A seta indica o infiltrado celular do tecido adiposo dos animais obesos. (D) Peso em gramas do tecido adiposo epididimal. (E) A área dos adipócitos realizada utilizando barra de escala de 100 $\mu$ m, sendo avaliado 10 campos por animal (CTL, n= 10, HSB, n=10). (F) Cálculo do número de adipócitos no tecido adiposo epididimal. Barras representam valores (média  $\pm$  DP) de um grupo (n = 10). \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 representam a diferença estatisticamente significativa entre os grupos medida pelo teste t de Student.

Além do ganho e da adiposidade, os animais alimentados com dieta HSB também apresentaram alterações na lipídemia, com aumento das concentrações e triglicerídeos e colesterol total, somados ao acúmulo de gordura nos hepatócitos (Fig. 7A-C).

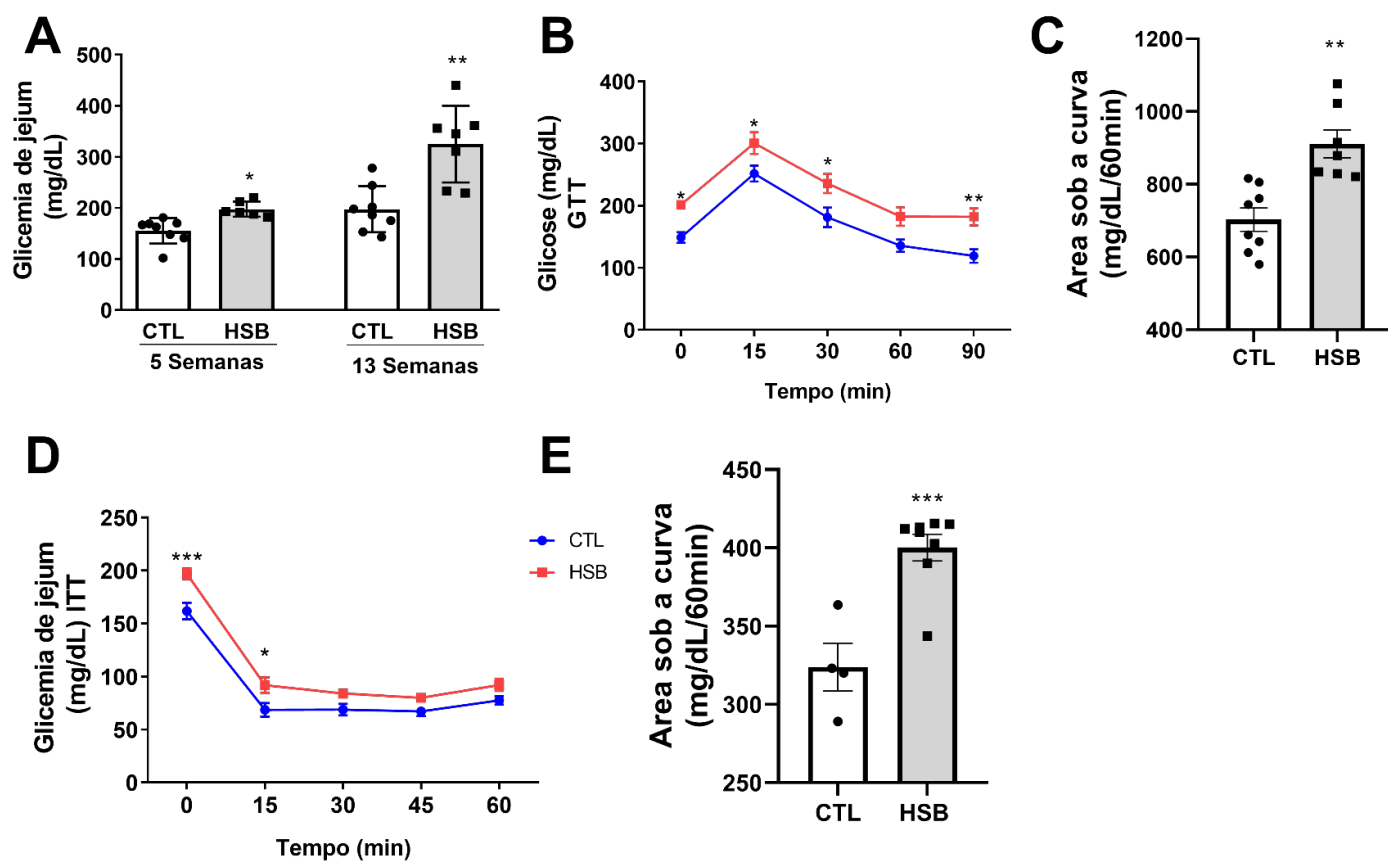


**Figura 7: O consumo da dieta HSB provoca dislipidemia em camundongos obesos.** Os níveis séricos de (A) colesterol total e de (B) triglicerídeos séricos foram avaliados por ensaio enzimático na décima



terceira semana de tratamento com dieta AIN93G ou HSB (Controle-CTL) ou HSB (obesos – HSB). A histologia do fígado foi obtida após 13 de semanas de consumo das dietas, os animais foram eutanasiados e fragmentos dos fígados foram retirados para avaliação histológica após coloração com H&E (C). Barras representam valores (média  $\pm$  DP) de um grupo (n = 7). (\*) representa a diferença estatisticamente significativa entre os grupos medida pelo teste t de Student (\* $p$ <0,05 \*\* $p$ <0,01).

Em adição, os camundongos alimentados com a dieta HSB apresentaram níveis de glicemia de jejum elevado (>250mg/dL) a partir da quinta semana de oferta da dieta HSB, comparado aos animais alimentados com a dieta AIN93G (Fig. 8A). Quando submetidos ao teste de tolerância oral a glicose (GTT), os camundongos obesos também demonstraram menor tolerância a glicose e maior resistência à insulina (Fig. 8B-E).

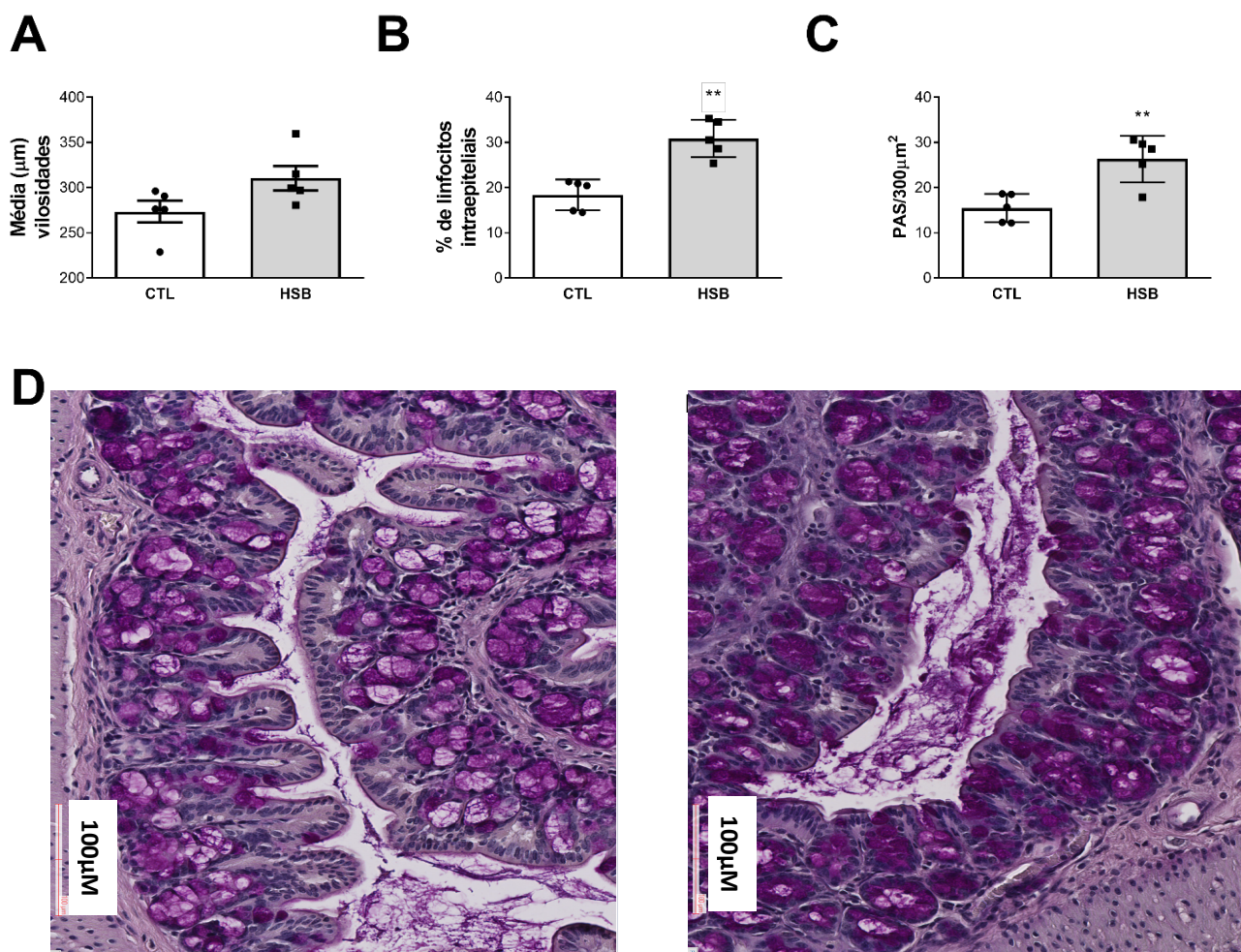


**Figura 8: O consumo da dieta HSB resultou em alterações na resposta à glicose em camundongos.** Foram avaliados os níveis de glicemia de jejum na quinta e na décima terceira semana de tratamento com as dietas AIN93G (controle - CTL) ou HSB (experimental). (A) Foi realizado o teste de tolerância oral a glicose e a glicemia foram medidas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração da glicose (B); e foi calculado a área sob a curva (AUC); (C) Área sob a curva da concentração sérica de glicose em

função do tempo (teste de tolerância à glicose). **(D)** Teste de tolerância a insulina foi feito utilizando insulina NPH na concentração de 0,75UI/Kg de peso, a glicemia foi aferida nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60min. **(E)** Área sob a curva obtida no teste de tolerância à insulina. Barras representam valores (média ± DP) de um grupo (n = 7 ou 8). (\*) representa a diferença estatisticamente significativa entre os grupos medida pelo teste t de Student (\*p<0,05 \*\*p<0,01).

### **A obesidade induzida por dieta HSB altera a homeostase intestinal**

Já é relatado na literatura que a obesidade e as co-morbidades associadas, como intolerância à glicose e alterações da microbiota, comprometem a homeostase da resposta imune intestinal (LUCK *et al.*, 2015). Além disso, existe correlação positiva entre hiperglicemia e aumento da permeabilidade intestinal devido ao aumento da expressão do transportador de glicose GLUT2 no ápice dos enterócitos na mucosa intestinal, o que resulta em disfunção da barreira intestinal (THAISS *et al.*, 2018). Assim, para melhor esclarecer esses fatos, foi avaliado se a obesidade no modelo em questão, seria capaz de comprometer a homeostase intestinal. Considerando a importância dos componentes da mucosa intestinal para o estabelecimento da tolerância oral, avaliamos a arquitetura do intestino por meio da medida da altura das vilosidades, da contagem do número de linfócitos intraepiteliais (IELs) e da produção de muco no colón, região da mucosa intestinal onde as células caliciformes mais abundantes. A altura das vilosidades intestinais não apresentou diferença entre os grupos (Fig. 9A). Os animais tratados com dieta HSB apresentaram aumento da frequência de IELs (Fig. 9B), e na produção de muco no colón (Fig. 9C-D). Os IELs são importantes para a manutenção da homeostase intestinal e para o estabelecimento da tolerância a proteínas da dieta (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2010; FROSSARD *et al.*, 2015), por isso a importância em avaliá-los.

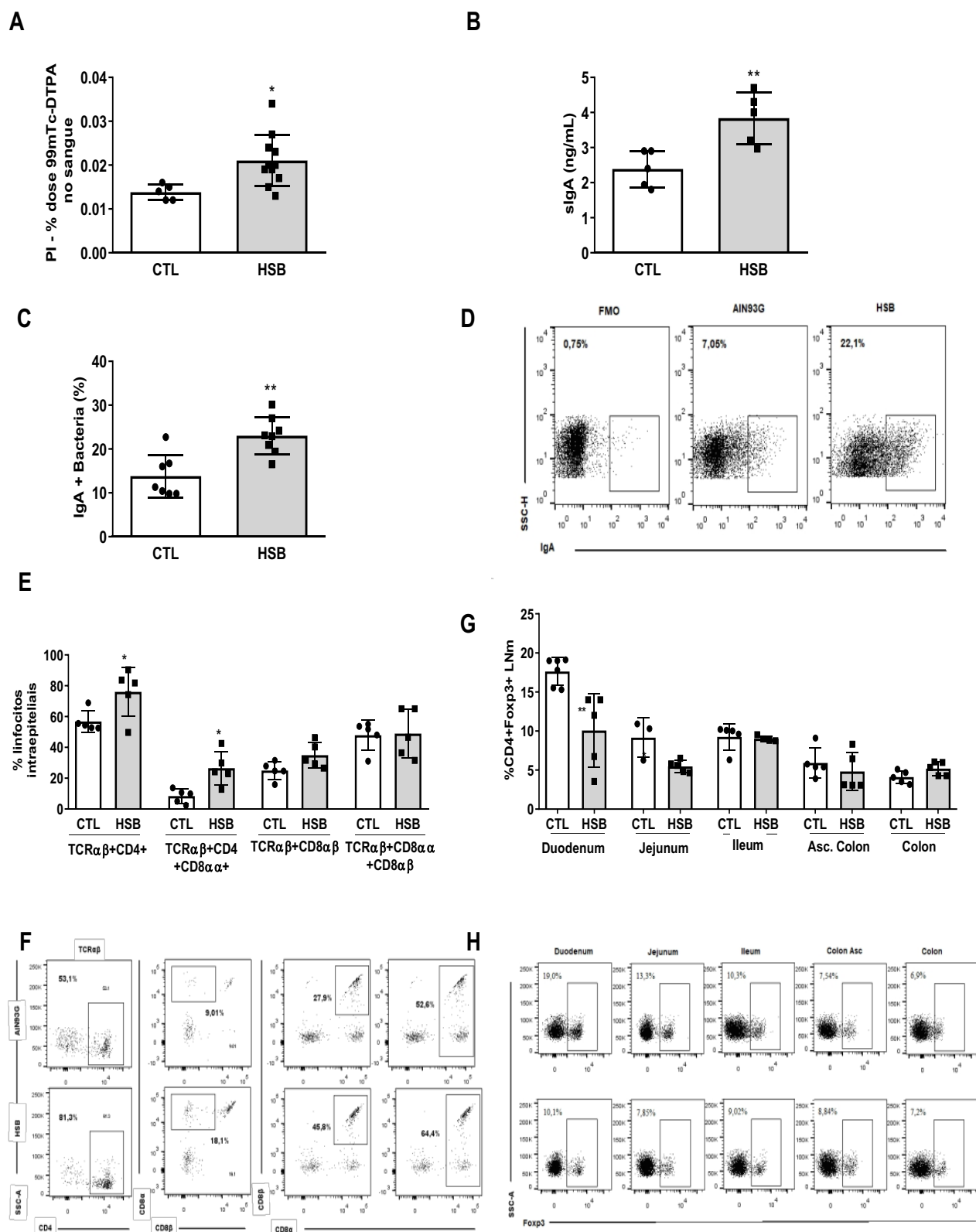


**Figura 9: A frequências de linfócitos intraepiteliais e produção de muco estão aumentados em camundongos tratados com dieta HSB.** (A) Medida do comprimento dos vilos do intestino delgado de camundongos tratados por 13 semanas com dieta AIN93G (controle - CTL) ou HSB (experimental). Foram selecionadas 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); (B) Frequência de linfócitos intraepiteliais no duodeno de camundongos tratados com dieta AIN93G ou HSB. 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 após coloração com H&E no aumento de 20x; (C) Representação gráfica da medida da intensidade de pixels representativa da área corada por PSA 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); (D) Imagem histológica representativa do cólon mostrando a localização das células caliciformes. O painel da direita representa os animais do grupo AIN93G e da esquerda HSB. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. (\*) representa a diferença estatisticamente significativa entre os grupos medida pelo teste t de Student (\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001).

O aumento da permeabilidade intestinal está relacionado a eventos potencialmente patológicos. Foi identificado que os camundongos que receberam dieta HSB por 13 semanas apresentam maior permeabilidade intestinal quando comparados aos camundongos controle (Fig. 10A). Além disso, os níveis de IgA secretória (SIgA) e a frequência de bactérias ligadas a IgA do colón avaliada por citometria de fluxo, também foram aumentadas em camundongos obesos (Fig. 10B-D).

Além do aumento da frequência de IELs detectados pela análise da histologia, esse dado foi confirmado por meio de análise por citometria de fluxo em animais obesos (Fig. 8E-F). Essas células regulam a resposta imune inata e adaptativa, e o aumento no seu número está associado à infecção e à inflamação intestinal (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2010).

Outras células importantes na manutenção da homeostase intestinal são as células Tregs. Um estudo recente mostrou que, além da mucosa intestinal possuir linfonodos especializados em drenar diferentes seguimentos do intestino (“drenagem compartimentalizada”), estes linfonodos também apresentam uma assinatura molecular e celular distinta que varia de acordo com a localização. Os linfonodos proximais como os do duodenal e do jejunal apresentam maior frequência de células Treg Foxp3<sup>+</sup> e DCs CD103<sup>+</sup> em comparação com mLN mais distais (ESTERHÁZY, DARIA; CANESSO; MESIN; MULLER; CASTRO; *et al.*, 2019). Para avaliar se a obesidade também poderia interferir na resposta celular nos linfonodos de animais com obesidade induzida por dieta, foi analisada a frequência de células FOXP3<sup>+</sup> nos mLNs. A frequência de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> estava reduzida nos mLNs duodenais e jejunais dos animais obesos quando comparada as dos animais controles (Fig. 10G). Já nos linfonodos que drenam o íleo, cólon ascendente e cólon não houve diferenças significativas na frequência de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Fig. 10G-H).

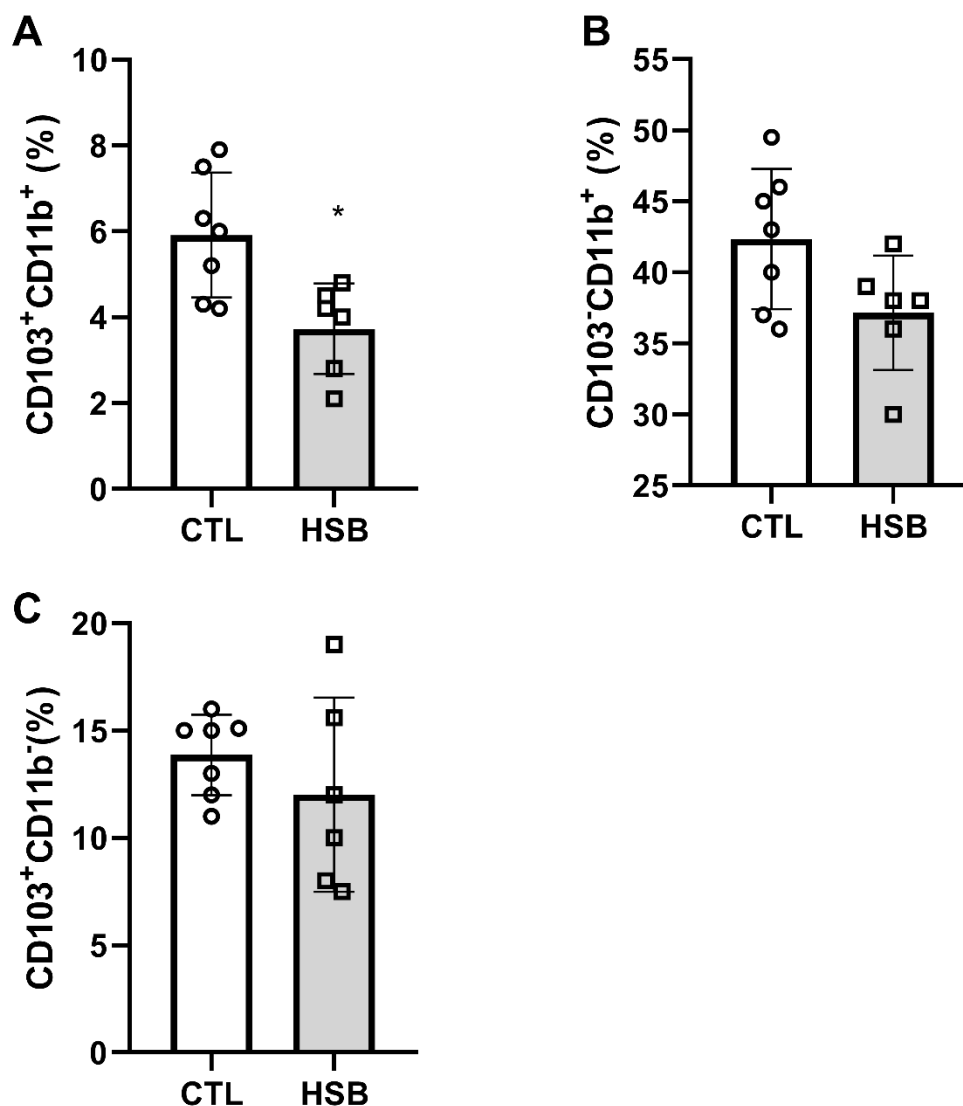


**Figura 10:** A obesidade induzida por dieta HSB resulta em alterações na mucosa intestinal. Os camundongos foram tratados com dieta AIN93G (controle - CTL) ou HSB (experimental) por 13 semanas, posteriormente foram eutanasiados para prosseguir com as análises. **(A)** Permeabilidade intestinal medida pela concentração plasmática de 99mTc-DTPA; **(B)** Concentrações de IgA secretória presente nas fezes

medida por ELISA; (C) Frequência de bactérias retiradas das fezes do intestino grosso ligadas à IgA; (D) *dot plots* representativos da análise por citometria de fluxo da frequência de bactérias da microbiota intestinal ligadas a IgA; (E) Frequência de IELs no epitélio do intestino delgado medida por citometria de fluxo; (F) representação das frequências de IELs TCR $\alpha\beta$  em *dot plots*; (G) Frequências de células Tregs CD4+Foxp3+ presentes dos LNMs (duodenal, jejunal, íleo e colón) avaliadas por citometria de fluxo. (H) *dot plots* representativos da frequência de células Tregs CD4+Foxp3+ nos LNMs. Os pontos nos gráficos representam os animais individualmente. (\*) representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) e (\*\*) ( $p < 0,01$ ) entre os grupos medida pelo teste t de Student.

O perfil expresso pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) também é importante na manutenção da homeostase intestinal. Assim, resolvemos investigar se a obesidade induzida por dieta poderia resultar em alterações na frequência de macrófagos e de células dendríticas nos linfonodos mesentéricos (LNMs). A frequência de macrófagos foi identificada utilizando a marcação MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> e as subpopulações de DCs foram identificadas como MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> e MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>.

Coombes e colaboradores (COOMBES *et al.*, 2007a), mostraram que as DCs, principalmente as CD103<sup>+</sup> em camundongos, são responsáveis pela captação de antígeno administrado por via oral e promovem a diferenciação de células T naive em células Treg. Por esta razão são consideradas tolerogênicas e as principais impulsionadoras da tolerância no intestino (MURRAY; WYNN, 2011; COOMBES *et al.*, 2007a). Nos camundongos com obesidade induzida pela dieta HSB, nós observamos redução da frequência de células CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (Fig.11A). Somado a este resultado a população de DCs CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>, também se apresentam reduzida nos animais obesos (Fig. 11B). Outro subconjunto de DCs envolvidas na indução de células Tregs FOXP3<sup>+</sup> *in vitro* via metabolização de AR são as CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> e é também o único subconjunto de DCs da mucosa que pode ativar o TGF- $\beta$  via expressão da integrina  $\alpha\beta 8$  (COOMBES *et al.*, 2007b), no entanto, essa população não apresentou diferença entre os grupos avaliados (Fig. 11C). Nos animais obesos também foi observada redução da frequência de macrófagos (Fig. 11D) nos LNMs, no entanto, não foi investigado o perfil destes.



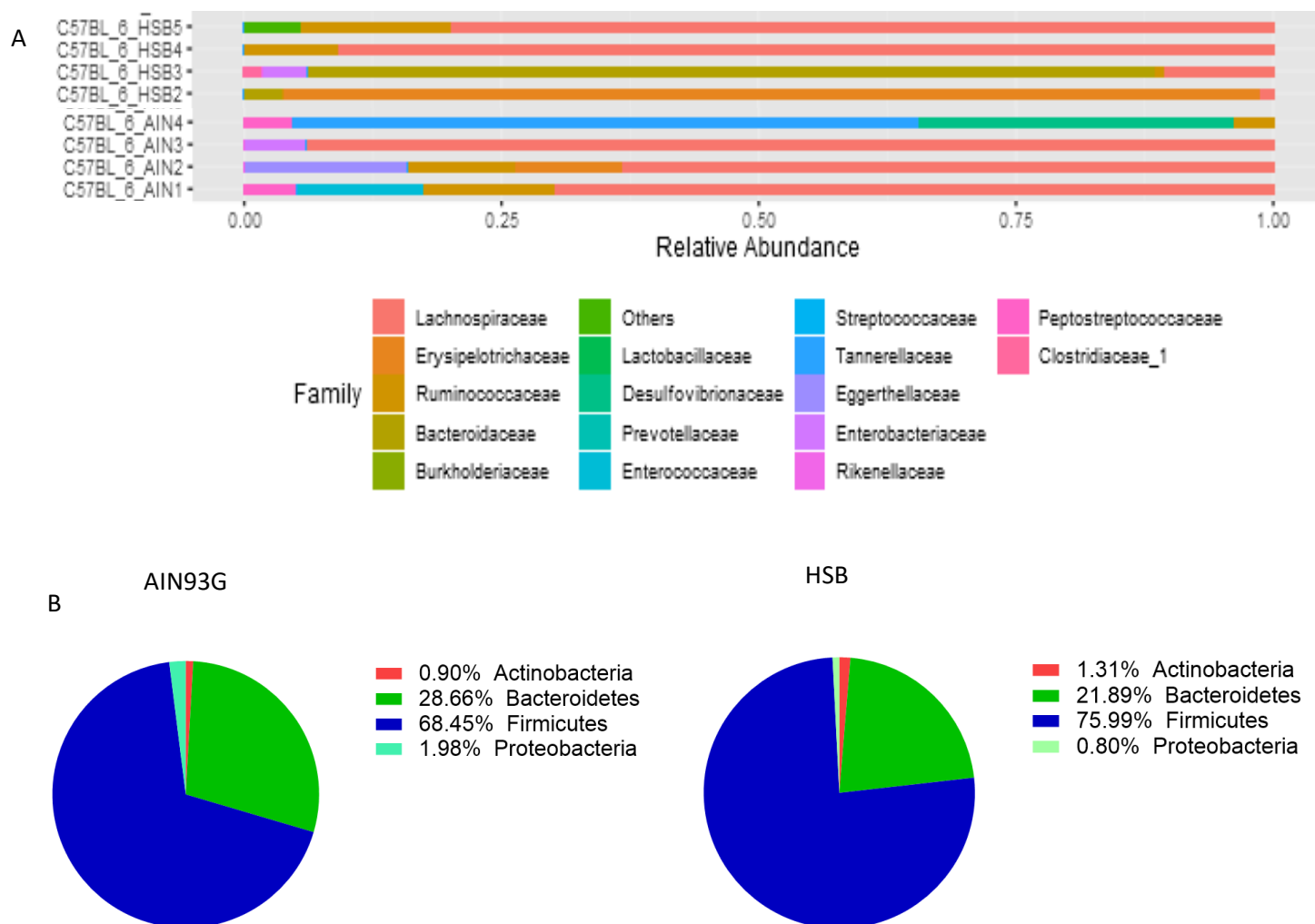
**Figura 11: A frequência de DCs tolerogênicas está reduzida em camundongos com obesidade induzida por dieta nos LNMs.** Os camundongos foram tratados com AIN93G (controle) ou HSB (experimental) por 13 semanas, posteriormente foram eutanasiados para prosseguir com as análises. As células foram isoladas dos linfonodos mesentéricos e marcadas com anticorpos específicos para cada molécula em questão e a determinação das frequências das sub-populações foram obtidas por citometria de fluxo. **(A)** DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>; **(B)** DCs CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>; **(C)** DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>. Resultados expressos pela média das frequências  $\pm$  desvio padrão. Cada símbolo representa *pool* de dois animais. (\*) representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) e (\*\*) ( $p < 0,01$ ) entre os grupos medida pelo teste t de Student.

### **Alterações da microbiota intestinal em camundongos obesos tratados com dieta hipercalórica (HSB)**

A obesidade e a síndrome metabólica estão associadas a uma microbiota intestinal alterada em comparação à microbiota de indivíduos saudáveis, conhecida como disbiose (Turnbaugh et al., 2006). Assim, além das alterações associadas a barreira intestinal e a resposta imune, a disbiose da microbiota intestinal também pode ser um componente importante para as complicações intestinais desencadeadas pela obesidade induzida por dieta. Nesse cenário avaliamos a composição da microbiota intestinal em camundongos obesos tratados com dieta HSB, e observamos que estes apresentavam uma menor diversidade microbiana e perda do equilíbrio dos filos bacterianos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* quando comparado aos animais controle (Fig. 12A-B). Estudo similar avaliou a composição da microbiota intestinal em camundongos tratados com dieta HSB e mostraram resultado similar ao considerar as análises de abundância relativa indicando o predomínio de *Firmicutes* e uma redução de *Bacteroidetes* (MOREIRA JÚNIOR *et al.*, 2019). Tanto em camundongos como em humanos, análises de metagenômica tem mostrado que a maioria das bactérias no intestino distal e nas fezes pertencem a dois principais filos bacterianos, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Gill et al., 2006). Camundongos magros mantêm um equilíbrio relativo entre esses dois filos bacterianos, mas, em modelos de camundongos obesos, uma proporção aumentada de *Firmicutes* para *Bacteroidetes* tem sido descrita mais frequentemente.

Le Chatelier et al., 2013, mostraram que a redução da riqueza bacteriana, indicada por uma baixa contagem de genes microbianos no DNA fecal, correlacionou-se com dislipidemia, resistência à insulina e inflamação. Já em condições contrárias, indivíduos com uma alta contagem de genes tiveram uma prevalência maior de espécies potencialmente anti-inflamatórias, como *Faecalibacterium prausnitzii*, que está associada com o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), incluindo butirato e acetato (LE CHATELIER *et al.*, 2013). Assim, as alterações apresentadas na microbiota intestinal de animais tratados com dieta HSB pode ser um fator que pode contribuir para as alterações intestinais apresentadas.





**Figura 12: O consumo da dieta HSB interfere na microbiota intestinal. (A)** Distribuição das unidades taxonômicas nas fezes de camundongos tratados com AIN93G (controle) ou HSB (experimental). **(B)** Distribuição dos filos de bactérias nas fezes de camundongos tratados com AIN93G ou HSB, evidenciando diferenças principais dentro de cada filo. n=4 ou 5.

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

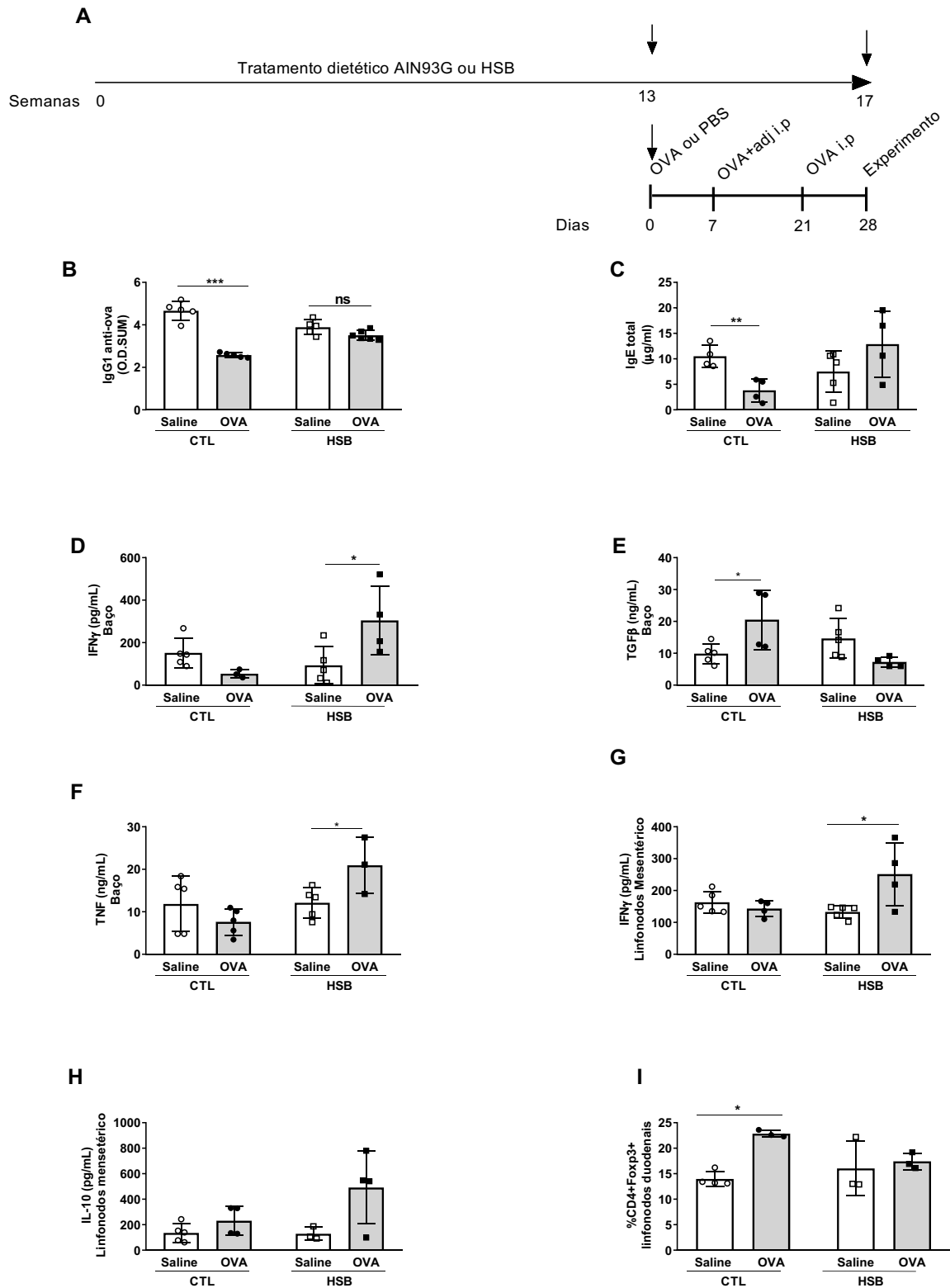
O conjunto de dados até o momento apresentados, mostra que o consumo da dieta HSB induziu um ambiente pró-inflamatório na mucosa intestinal devido ao aumento da permeabilidade intestinal, e pela alteração da frequência de IEL e de células dendríticas, o que pode comprometer os mecanismos de proteção e de regulação. Sendo assim, foi avaliado se os animais obesos apresentavam capacidade preservada de desenvolver tolerância oral, uma vez que esse fenômeno depende da homeostase e da integridade da mucosa (WEINER, HOWARD L. *et al.*, 2011). Assim, tanto os animais obesos, quanto

os controles foram tratados por via oral com 10mg de OVA, 7 dias após foram imunizados i.p. com OVA e Al(OH)<sub>3</sub>. Após 14 da primeira imunização, os animais receberam um reforço com 10µg/OVA i.p. Passados 7 dias do reforço, o experimento foi realizado e as concentrações séricas de imunoglobulinas foram medidas por ELISA. Os camundongos controles mostraram níveis séricos de IgG1 anti-OVA e IgE total reduzidos comparados com os controles que receberam apenas imunização (Fig. 13A-C). No entanto, camundongos obesos alimentados com a dieta HSB apresentaram resistência à indução de tolerância oral, conforme demonstrado por seus níveis sérico de IgG1 anti-OVA e IgE total similares aos animais obesos que receberam apenas a imunização (Fig. 13A-C).

As células dos linfonodos mesentéricos e do baço foram preparados para cultivo e estimulados *in vitro* com 100µg/mL de OVA para avaliar a resposta celular após o tratamento oral com OVA. Ao analisar as concentrações de citocinas nos sobrenadantes após 48 ou 72 horas de cultivo, identificou-se que a concentração de IFN- $\gamma$  estava aumentada no sobrenadante das células do baço e mLNs dos camundongos obesos após a indução de tolerância oral (HSB+OVA) (Fig. 10D e 10G). Já a concentração de TGF- $\beta$  estava aumentada apenas no grupo controle que recebeu OVA por via oral (Fig. 13E). A concentração de IL-10 foi semelhantes entre os grupos controle e obesos, imunizados e os que receberam OVA oral (Fig. 13F).

Estudos anteriores mostraram que as iTregs são necessárias para a indução da tolerância oral (MUCIDA, D. *et al.*, 2005; BILATE; LAFAILLE, 2012; ZHANG *et al.*, 2001). Nesse cenário, ao avaliar a frequência de células Tregs, foi observado aumento na frequência dessas células somente no grupo controle tratado com OVA por via oral, quando comparados com camundongos somente imunizados. Nenhuma diferença foi encontrada na frequência dessa população de células entre os animais obesos tratados com OVA por via oral ou imunizados (Fig. 13I-J). Assim, a falta de estimulação ou baixa secreção de TGF- $\beta$  pode estar associada a uma redução nas células secretoras, como Tregs. Entre as células T reguladoras, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> induzidas, mas não naturais, que expressam Foxp3 são as mais relevantes para o desenvolvimento da tolerância oral (MUCIDA *et al.*, 2005a). Um dos principais mecanismos subjacentes à ação das células Tregs inclui a produção de citocinas inibitórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (CAO *et al.*, 2007) e a supressão da produção de células IFN- $\gamma$ . Então, esses dados indicam que a obesidade prejudica a indução de tolerância oral devido à não supressão de IgG1 anti-OVA específico e de IgE total. Além disso, a falha na indução de tolerância

oral está associada a ausência de aumento na produção de TGF $\beta$ , e de aumento da frequência de Foxp3<sup>+</sup> nos camundongos obesos.



**Figura 13:** A obesidade induzida por dieta está associada a falha na indução de tolerância oral ao antígeno administrado por gavagem. Camundongos C57BL/6 machos tiveram a indução de obesidade

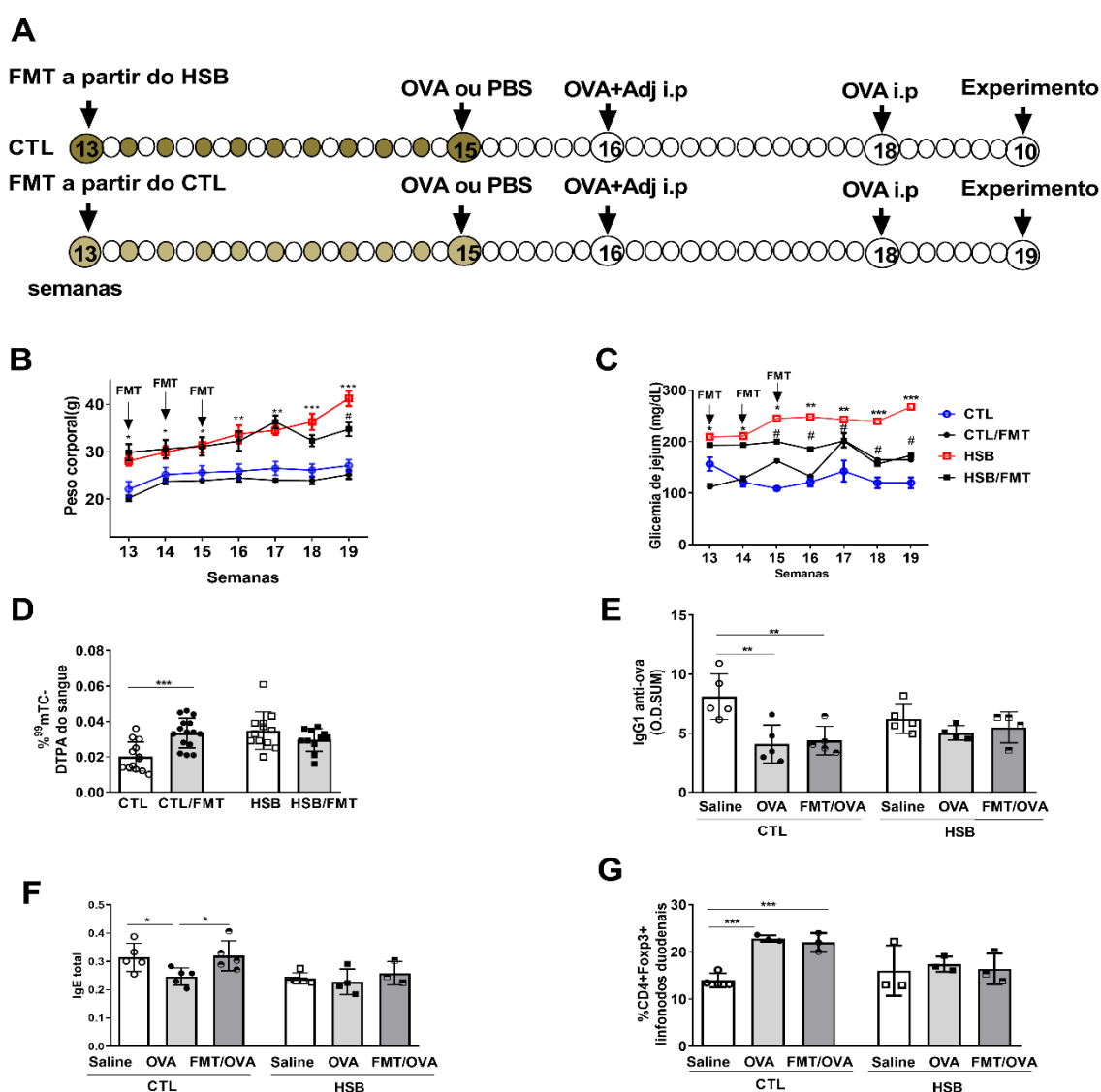
com dieta HSB por 13 semanas. Como controle os animais receberam dieta AIN93G, e posteriormente receberam 10mg de OVA por via oral (gavagem) ou salina (Controle - CTL) ou HSB (obesos – HSB). As dietas foram mantidas durante todo o protocolo experimental. (A) Desenho experimental utilizado para a indução de TO; (B) Níveis séricos de IgG1 anti-OVA medidos por ELISA de animais C57BL/6 tratados com OVA ou salina via oral (gavagem). Os resultados estão expressos como média aritmética  $\pm$  desvio das OD do soro (O.D. SUM); (C) Níveis séricos de IgE total medidos por ELISA. Para avaliação da resposta celular, suspensões de células do baço e linfonodos mesentéricos foram estimuladas com 100 $\mu$ g/ml de OVA e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 ou 72 horas após, o sobrenadante foi coletado para medida das citocinas por meio de ELISA. (D-H) Os resultados representam o valor da concentração de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF e IL-10 medidos nos sobrenadantes de células estimuladas com OVA do baço e do mLN, respectivamente; (I) Frequência de células Tregs CD4+FoxP3+ nos mLN após a indução de TO analisadas por citometria de fluxo. Cada símbolo indica um animal experimental (n=5) (\*) representa a diferença estatisticamente significativa (p<0.05) e (\*\*) (p<0,01) entre os grupos medida pelo teste t de Student bicaudal.

### **A modulação da microbiota não foi suficiente para recuperar a capacidade de indução de tolerância oral em camundongos obesos**

Trabalhos anteriores mostraram que a modulação da microbiota por transferência fecal (FMT) de camundongos magros para obesos previne alterações metabólicas, melhora a tolerância à glicose, a resposta à insulina e diminui o acúmulo de gordura corporal (THAISS et al., 2016). Desta forma, investigamos se a modulação da microbiota em camundongos obesos poderá, não somente melhorar o metabolismo, mas também melhorar a resposta aos antígenos observada pela indução de tolerância oral. Para isso, as fezes dos camundongos controles, doadores magros, foram transferidas para camundongos obesos e, as fezes dos camundongos obesos foram transferidas para os camundongos controles magros a cada dois dias, durante 21 dias por via oral (Fig. 14A). Ao final do tratamento, os camundongos obesos tiveram melhora na glicemia de jejum, e os animais magros que receberam as fezes de obesos não mostraram alterações (Fig. 14B-C). Observamos também, aumento da permeabilidade intestinal nos camundongos do grupo controle que receberam FMT dos animais obesos, enquanto os camundongos obesos que receberam FMT de animais magros não apresentaram diferença (Fig. 14D).

Embora os camundongos magros que receberam FMT de camundongos obesos tenham mostrado permeabilidade intestinal aumentada, eles ainda foram capazes de desenvolver tolerância oral, pois mostraram redução na concentração de IgG1 anti-OVA quando tratados com OVA por via oral antes da imunização, embora os níveis de IgE

total não foram alterados (Fig. 14E-F). Em contraste, não foi identificada nenhuma diferença na concentração sérica de IgG1 anti-OVA, IgE total e nem na frequência de células Tregs nos LNMs após indução de tolerância oral em camundongos obesos que receberam fezes dos camundongos magros (Fig. 14E-G). Sendo assim, a transferência da microbiota possivelmente saudável para camundongos obesos não foi suficiente para reestabelecer a homeostase intestinal e a capacidade de indução de tolerância oral durante o consumo de dieta HSB.



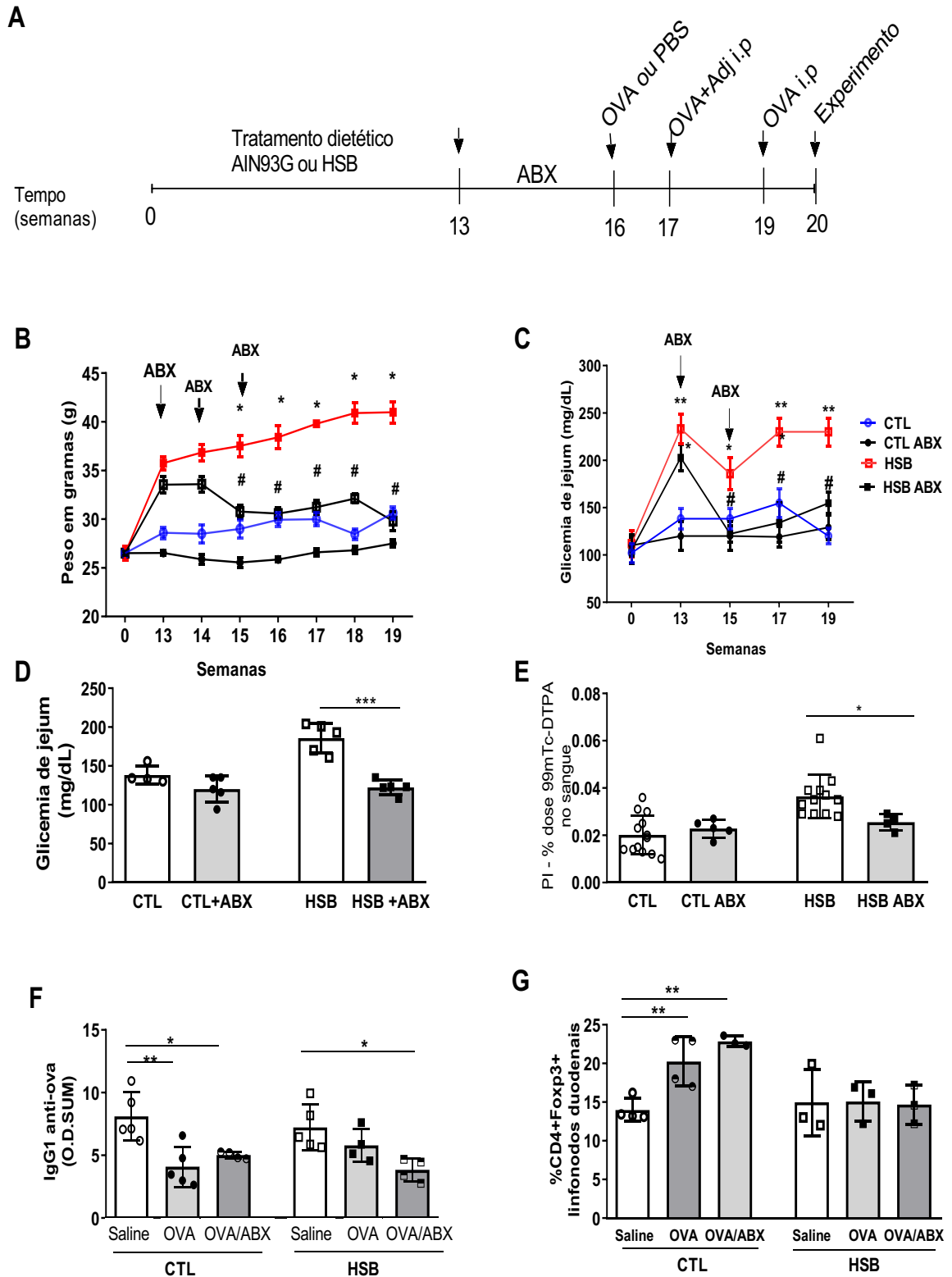
**Figura 14:** A modulação da microbiota intestinal não altera a permeabilidade intestinal e não favorece a indução de tolerância oral em camundongos obesos. (A) Estratégia experimental: primeiramente os camundongos receberam as dietas AIN93G ou HSB por 13 semanas. Em seguida foi iniciado o protocolo de transferência fecal que foi realizada via injeção intragástrica de 200 $\mu$ L de suspensão

de fezes a 100mg/mL. Os animais obesos (HSB) receberam fezes de doadores controles magros (CTL), e vice-versa, em dias alternados durante 21 dias. Após as FMT os animais receberam OVA (10mg), por gavagem e posteriormente foram imunizados. O tratamento dietético se manteve em todo o tempo do experimento. **(B)** Evolução do peso durante a transferência fecal e a indução de tolerância oral; **(C)** Glicemia de jejum (\*) diferença entre o grupo HSB e CTL; (#) diferença do grupo HSB/FMT e o CTL; e (\$) diferença entre o grupo CTL/FMT e CTL; **(D)** Permeabilidade intestinal medida pela concentração plasmática de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA; **(E-F)** Níveis séricos de IgG1 anti-OVA e IgE total de camundongos CTL e HSB após a indução de TO; **(G)** Frequência de células Tregs nos LNM avaliada por citometria de fluxo. (\*) representa diferença estatisticamente significativa medida por ANOVA. N=5 animais/grupo. Experimento representativo de 2.

### **O tratamento com antibióticos melhora a indução de tolerância oral em camundongos obesos**

Como mostrado, o consumo de dieta com excesso de gordura e açúcar é capaz de induzir disbiose intestinal. Além disso, é verdadeiro que existe uma ligação direta entre obesidade e hiperglicemia, com alterações da microbiota intestinal, capaz de prejudicar homeostase imunológica e a transferência de fecal não foi suficiente para indução de tolerância oral nos camundongos obesos. Assim, para investigar se a microbiota dos camundongos obesos é capaz de prejudicar a indução de tolerância oral, as bactérias foram removidas pelo tratamento oral com coquetel de antibióticos (ABX) durante 21 dias consecutivos (Fig. 15A), até ser observado redução visível do crescimento de bactérias avaliado por meio da incubação das fezes em meio tioglicolato.

Os camundongos obesos que receberam ABX perderam peso, melhoraram a glicemia de jejum e a permeabilidade intestinal, quando comparados com obesos sem tratamento com ABX (Fig. 15B-E). Além disso, os camundongos obesos tratados com ABX mostraram diminuição da concentração sérica de IgG1 anti-OVA e IgE total após a administração oral de OVA (Fig. 15F). No entanto, nenhuma diferença foi encontrada na frequência de células Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos mLNs dos animais obesos (Fig. 15G). Assim, nossos dados sugerem que a dificuldade em induzir TO em camundongos obesos pode estar associada à microbiota intestinal alterada pela dieta.



**Figura 15: O tratamento com antibiótico (ABX) favorece a indução de tolerância oral em camundongos obesos.** (A) Estratégia experimental. Camundongos C57BL/6 machos tiveram a indução de obesidade com dieta HSB por 13 semanas. A antibiótico-terapia foi iniciada na 13ª semana experimental e na 16ª semana os animais receberam 10mg de OVA por via oral (gavagem) ou salina (Controle-CTL) ou

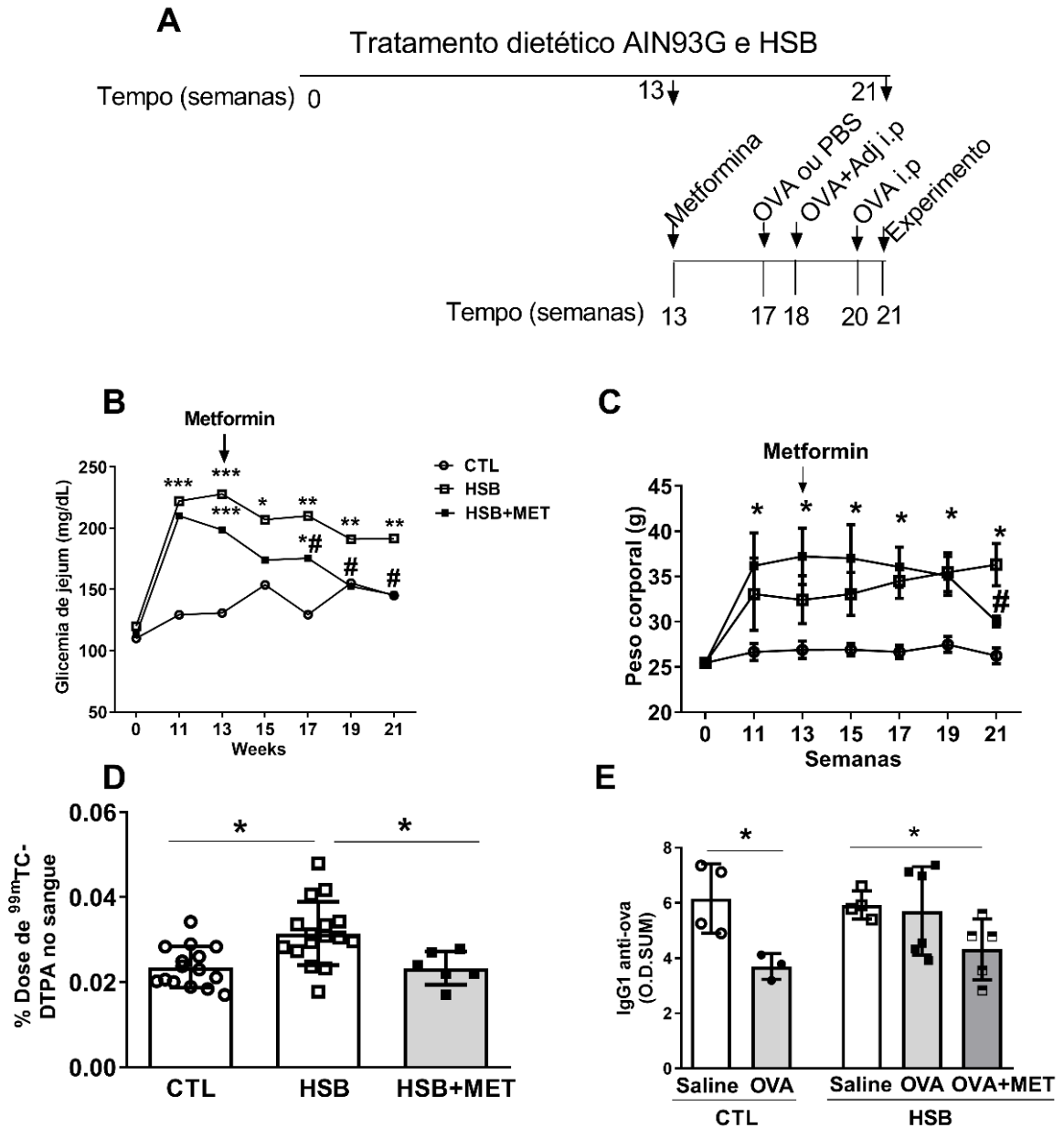
HSB (obesos – HSB). As dietas foram mantidas durante todo o protocolo experimental. Antibióticos: ciprofloxacina (0,2g/l, Sigma-Aldrich), metronidazol (1g/l, Sigma- Aldrich) e vancomicina (0,5g/l, Sigma-Aldrich) por gavagem por 21 dias. (B) Evolução do peso durante o tratamento com antibiótico e indução de tolerância oral. (C-D) Glicemia de jejum medida semanalmente após o tratamento com antibióticos e indução da tolerância ora. (E) Permeabilidade intestinal medida ao final de todo protocolo experimental; (F) IgG1 anti-OVA de animais C57BL/6 tratados com OVA ou salina via oral (gavagem) após o tratamento com antibióticos; (G) Frequência de células Tregs CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> analisada por citometria de fluxo. Controle (CTL), camundongo obeso (HSB), obeso tratado com antibiótico (HSB ABX). Cada símbolo indica um animal individual (n=5). (\* ou #) representa diferença estatisticamente significativa medida por ANOVA. (\*) diferença entre CTL e HSB. (#) diferença entre HSB/ABX e HSB.

### **A hiperglicemia perturba a indução de tolerância oral em camundongos**

Um estudo prévio correlacionou a hiperglicemia ao aumento da permeabilidade intestinal, independentemente da obesidade (THAISS et al., 2018). Além disso, nosso grupo recentemente mostrou que camundongos NOD (diabéticos não obesos) que desenvolvem DM1 espontaneamente como resultado de alterações genéticas e ambientais, eram refratários à indução de tolerância oral e apresentavam várias alterações na mucosa intestinal (MIRANDA *et al.*, 2019). Somando essas informações, nos perguntamos se a resistência à tolerância oral se dá pela hiperglicemia independente da obesidade. Para responder a esse questionamento, resolvemos primeiramente tratar a hiperglicemia dos animais obesos.

Assim, foi realizado o tratamento dos camundongos obesos com Metformina (1g/L) por 21 dias (Fig. 16A), até que a glicemia fosse semelhante aos do controle (Fig. 16B). Essa droga é usada no controle da captação de carboidratos no intestino e para diminuir a hiperglicemia. Os camundongos que estavam obesos devido ao consumo da dieta HSB perderam peso com o tratamento, mas ainda assim, mantiveram o peso diferente do observado nos camundongos controle magros que receberam a dieta AIN93G (Fig. 16C). Além disso, o tratamento com Metformina também reduziu a permeabilidade intestinal (Fig.16D). Os camundongos obesos tratados com Metformina e que receberam 10mg OVA por gavagem antes da imunização, ficaram tolerantes à OVA, conforme medido por níveis reduzidos de IgG1 anti-OVA no soro (Fig. 16E). Os dados aqui apresentados então sugerem mais uma vez que a hiperglicemia é mais determinante para o aumento da permeabilidade intestinal e para a resistência à indução de tolerância oral do que o excesso de peso.



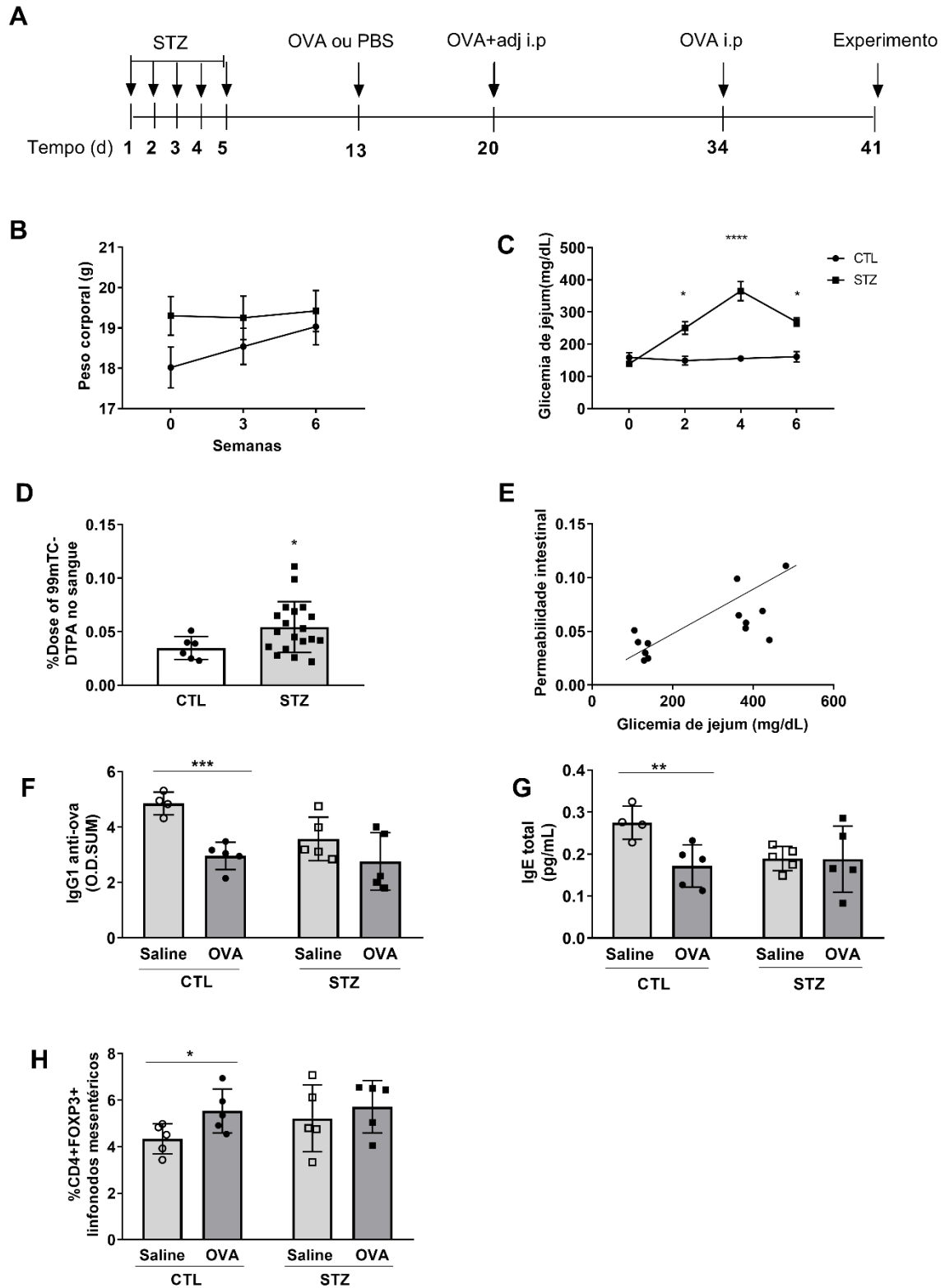


**Figura 16: O tratamento da hiperglicemia por Metformina restaurou a capacidade de induzir tolerância oral em camundongos obesos. (A)** A obesidade foi induzida pelo consumo de dieta HSB durante 13 semanas e posteriormente iniciou-se o tratamento com Metformina comercial (1g/kg de camundongos) durante 21 dias. Ao final do tratamento com Metformina, os animais receberam OVA (10mg) em única administração por via oral, e após 7 dias foram imunizados com OVA (10µg/mL) em Al(OH)<sub>3</sub>. O as dietas foram mantidas durante todo o período experimental; **(B)** Glicemia em jejum de camundongos alimentados com dieta controle (controles-CTL) ou dieta HSB (obesos - HSB) e obesos tratados com Metformina (1g/kg) por 21 dias (HSB+MET); **(C)** Peso corporal avaliado durante todo o experimento; **(D)** Permeabilidade intestinal determinada pela difusão da radioatividade no sangue após a administração oral de ácido dietileno-triamino-penta-acético (DTPA) marcado com tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc) realizado após os tratamento com Metformina e OVA; **(E)** IgG1 anti-Ova específico no soro de camundongos CTL, HSB e HSB+MET a indução de tolerância oral. N=4 a 6 animais/ grupo. (\*) representa

diferença estatisticamente significativa entre  $p \leq 0,05$  e  $0,01$  e (#) a diferença entre HSB e HSB metformina  $p \leq 0,05$  e  $0,01$  medida por ANOVA.

Para confirmar se a hiperglicemia seria de fato o fator que altera a permeabilidade intestinal e a indução de tolerância oral em camundongos, utilizamos um modelo de que se assemelha a diabetes tipo 1 induzida pelo fármaco estreptozitocina (STZ), sem aumentar o peso dos animais. Para isso os camundongos receberam STZ na concentração de 50mg/kg i.p. durante 5 dias (Fig. 17A). O mecanismo de aumento da glicemia é mediado pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas (FURMAN, 2015). Assim, após uma semana de tratamento com STZ, a glicemia de jejum foi aferida e os resultados mostraram concentrações superiores a 250mg/dL caracterizando a presença da diabetes, sem haver alteração no peso (Fig. 17B e C).

Em seguida a tolerância oral foi induzida por gavagem única com 10mg de OVA seguida de imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> via i.p. O tratamento com STZ aumentou a permeabilidade intestinal, e a permeabilidade apresentou correlação positiva com níveis os de glicose sanguínea (Fig. 17D e E). Curiosamente, o tratamento com STZ parece perturbar a indução de tolerância oral, uma vez que camundongos que receberam OVA por gavagem após o STZ, não mostraram diferença nos níveis de IgG1 anti-OVA e IgE (Fig. 17F-G) comparado ao grupo que recebeu STZ e não recebeu OVA por via oral. Com relação às células Treg, também não houve diferença significativa após a gavagem de OVA em camundongos tratados com STZ (Fig. 17H). Desta forma, os resultados mostraram que a hiperglicemia aumenta a permeabilidade intestinal e prejudica a indução de tolerância oral, mesmo em camundongos não obesos.



**Figura 17: O tratamento com STZ induz hiperglicemia, alteração da permeabilidade intestinal e resulta em falha na indução de tolerância oral. (A)** Esquema experimental: a STZ foi administrada via i.p. durante 5 dias consecutivos (40mg/kg), a glicemia de jejum e o peso foram aferidos ao longo do experimento. Uma semana após o tratamento com STZ os animais receberam OVA ou salina por gavagem,

seguida de imunização com OVA (10 $\mu$ g/ml) em 1mg/mL de Al(OH)<sub>3</sub>. **(B)** Evolução do peso; **(C)** Glicemia de jejum; **(D)** Permeabilidade intestinal; **(E)** Correlação entre permeabilidade intestinal e glicemia de jejum; **(F-H)** Níveis séricos de IgG1 anti-OVA e IgE Total; **(G)** Frequência de células Tregs nos LNM avaliada por citometria de fluxo. N=4 a 6 animais/ grupo. (\*) representa diferença estatisticamente significativa avaliada pelo teste t de Student.

### **A obesidade aumenta a gravidade de alergia alimentar induzida com ovalbumina**

A obesidade é um estado inflamatório, e pode estar correlacionada ao maior risco de aparecimento de alergia alimentar e de doenças inflamatórias intestinais (LUCK et al., 2019; VISNESS et al., 2009). Para investigar se a falha na indução de tolerância oral em camundongos obesos poderia favorecer o desenvolvimento de alergia alimentar, camundongos C57BL/6 foram imunizados com 10 $\mu$ g de OVA em 1mg de Al(OH)<sub>3</sub> via intraperitoneal; 7 dias após a imunização foram desafiados por via oral com OVA em solução aquosa (20% de OVA) por sete dias consecutivos (Fig. 18A) (SALDANHA *et al.*, 2004).

Uma das características do modelo de alergia alimentar a OVA, é a diminuição da ingestão da solução de OVA por animais sensibilizados, e a perda de peso corporal (SALDANHA *et al.*, 2004). No entanto, os nossos resultados mostraram que os camundongos sensibilizados apresentaram ingestão equivalente da água com OVA em comparação com camundongos não sensibilizados (Fig. 18B). Porém, os camundongos obesos sensibilizados apresentaram perda de peso, diferente dos camundongos controles (Fig. 18 C).

Os animais sensibilizados previamente apresentaram aumento significativo da concentração de IgG1 sérica anti-Ova quando comparados aos não sensibilizados (Fig. 18D). Além disso, a sensibilização isoladamente induziu aumento da concentração de IgE, mas curiosamente, diferente dos camundongos controles magros que apresentaram aumento de IgE total após a sensibilização, camundongos obesos apresentaram títulos maiores de IgE total quando somente desafiados por via oral com solução de OVA (Fig. 18E).

Para investigar se a alergia alimentar a OVA poderia resultar em anafilaxia, foi realizado o teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA) *in vivo* por extravasamento de azul

de Evans. A imunização com OVA levou ao maior extravasamento após a injeção intradérmica de OVA nos obesos sensibilizados quando comparada com camundongos obesos não sensibilizados (Fig. 18G). Assim, esses dados sugerem que a indução de tolerância oral é prejudicada em animais obesos e que isto pode contribuir para o aumento da gravidade da alergia alimentar, considerando os fatores perda de peso, aumento dos níveis séricos de IgG1 anti-OVA e aumento da permeabilidade capilar.



**Figure 18: A obesidade induzida por dieta agrava o desenvolvimento de alergia alimentar em camundongos.** (A) Modelo experimental de indução de obesidade de dieta HSB após 13 semanas seguido de sensibilização subcutânea (s.c.) com 10µg de OVA em Al(OH)<sub>3</sub>. A sensibilização secundária consistiu em uma injeção s.c. de 10µg de OVA 14 dias após a sensibilização primária (16ª semana). Sete dias após a sensibilização secundária (ou seja, na semana 17), a garrafa contendo água foi substituída por água com 20% OVA por um período de sete dias. (B) Medida da ingestão de solução de OVA; (C) Porcentagem de variação do peso dos camundongos até 21 dias após a primeira sensibilização com OVA; (D e E) Níveis séricos de IgG1 anti-OVA e IgE total de camundongos sensibilizados com OVA medido por ELISA; (F) Determinação de IgE específicos para OVA, em ensaio de anafilaxia cutânea passiva (PCA). Esse experimento foi realizado após o período de sensibilização. Os animais receberam uma injeção via intradérmica no dorso contendo OVA (20 µg) e PBS, seguido por uma injeção intravenosa na cauda do corante Azul de Evans (1mg/ml). Após 30min, os camundongos foram sacrificados e a pele foi removida para visualização da reação. N=4 a 6 animais/ grupo. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa medida por ANOVA.

### **A hiperglicemia associada à obesidade está correlacionada a altos níveis de IgE e alterações na mucosa intestinal em humanos**

O conceito mais simplista de alergia alimentar é, uma resposta imune adversa (hipersensibilidade) aos alimentos e pode ser dependente de IgE (GOULD; SUTTON, 2008). Os altos níveis de IgE do plasma refletem a predisposição alérgica em geral (SAMPSON et al., 2018). Estudos anteriores mostraram correlação positiva entre obesidade e sintomas alérgicos, e níveis mais elevados de IgE em crianças e adultos obesos (ANVARI et al., 2019; WEINER, H. L., 1994). Além disso, um estudo transversal realizado com 8.856 adultos na China mostrou que indivíduos pré-diabéticos apresentaram correlação positiva entre níveis elevados de glicose e IgE (WANG, H. et al., 2017).

Sendo assim, após observar a quebra na tolerância oral e o aumento da resposta alérgica à OVA em camundongos obesos, tentamos fazer a translação dos achados em camundongos para humanos. Assim, avaliamos os níveis séricos de IgE, e outros parâmetros clínicos no plasma de pacientes, obesos e obesos com DM2 como descrito na Tabela 3. Foi identificado um aumento da concentração séricas de IgE total em pacientes obesos com DM2, quando comparados a pacientes obesos sem hiperglicemia (Fig. 19A). Em adição, as concentrações séricas de IgE apresentaram uma correlação positiva com hemoglobina glicada e glicemia de jejum (Fig. 19B-C).

Além disso, avaliamos a expressão de genes relacionados a resposta imune a ao metabolismo em biopsias de jejuno de pacientes obesos sem alterações na, em comparação com obesos com DM2. Entre os genes avaliados, identificamos regulação negativa de IL-22, IL-10, Foxp3, ZO-1 e claudina 2, e regulação positiva de IL-33 e IL-5 em indivíduos obesos com DM2 (Fig.20).

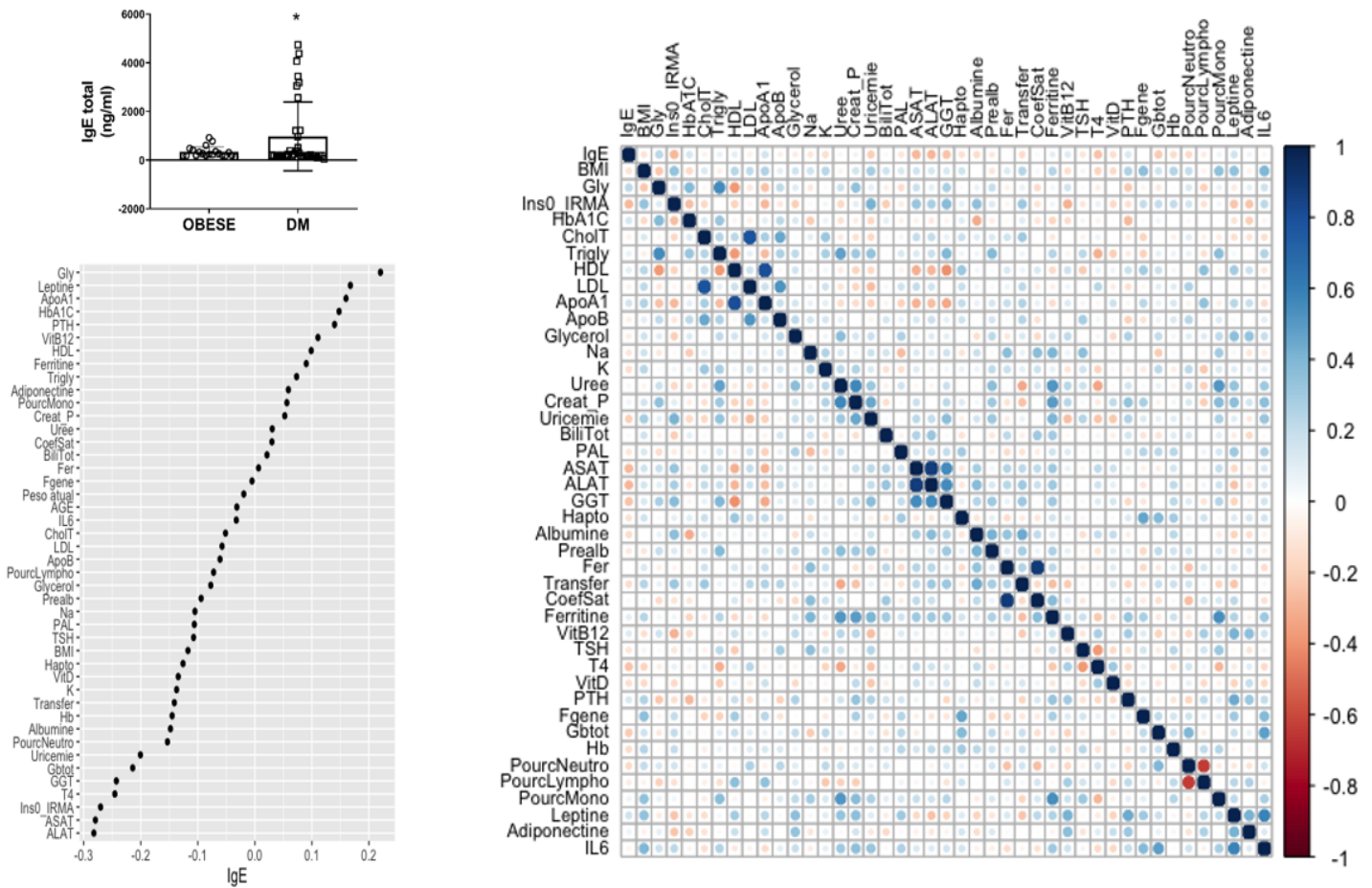
Juntos, esses dados sugerem que, de forma semelhante aos efeitos em camundongos, a obesidade associada à hiperglicemia, está relacionada com perda da homeostase intestinal e com níveis aumentados de IgE.

**Tabela 3: Parâmetros clínicos e biológicos da coorte do estudo.**

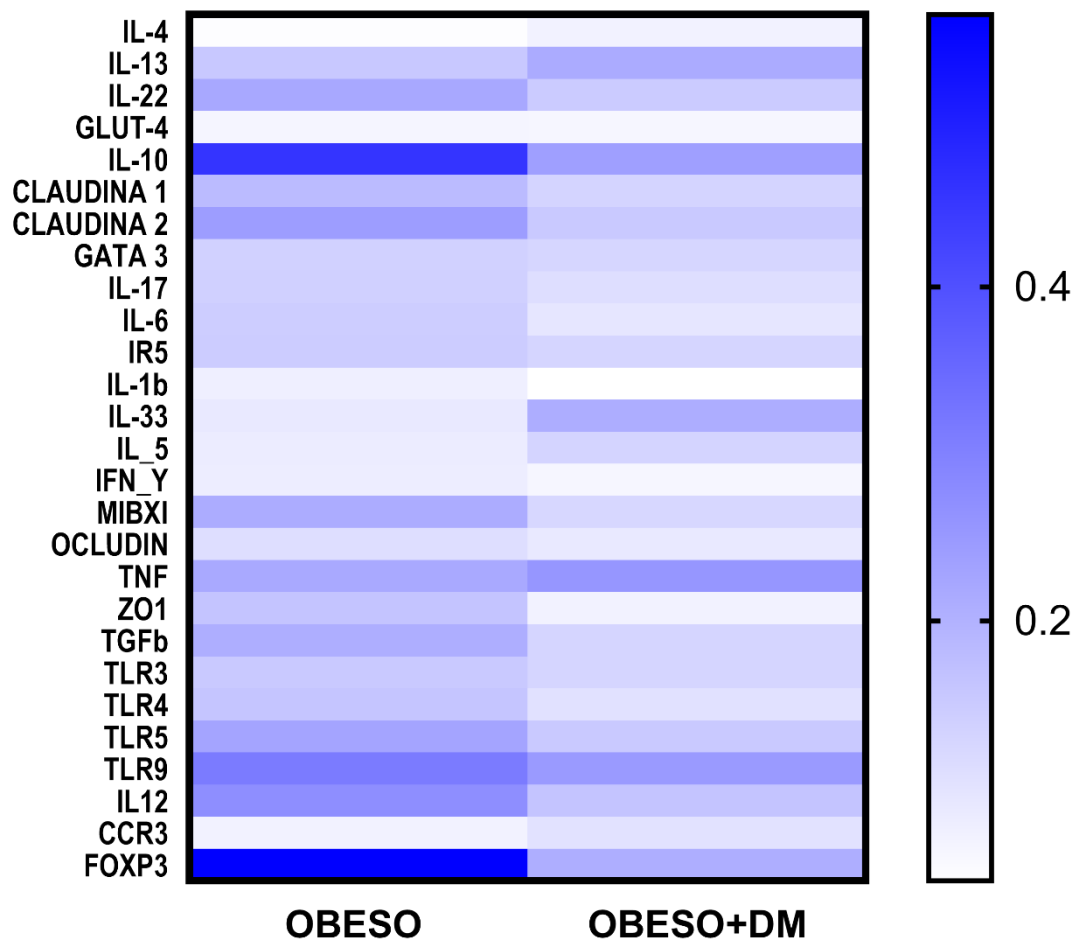
	<b>Ob</b>	<b>Ob/DM</b>
	n=30	n=30
<b>Idade em anos</b>	39,8 (9,45) 25-57	52,5 (11,21) 28-70
<b>Feminino, n (%)</b>	76,7% (23)	63,3% (19)
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>	43,9± 6,464	42,3±7,39
<b>Glicemia de jejum, mM</b>	4,77+0,3538 <sup>a</sup>	9,86±1,62 <sup>b</sup>
<b>HbA1c, %</b>	5,17+ 0,84 <sup>a</sup>	8,06±1,19 <sup>b</sup>
<b>HOMA-IR</b>	2,89+ 1,53 <sup>a</sup>	8,75±7,19 <sup>b</sup>
<b>IL-6</b>	4,07+2,1	5,05±3,3
<b>Adiponectina</b>	4,93+1,92	3,29±1,16
<b>Colesterol Total, mM</b>	4,68±1,02	4,53±1,17
<b>Triglicerídeos, mM</b>	1,27±0,5	2,09±0,74
<b>IgE</b>	333,3±47,74 <sup>a</sup>	978,4±238,8 <sup>b</sup>

Os dados são expressos como média ± DP. A análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes (a, b) mostram significância estatística (P <0,05).





**Figura 19: IgE é associada com indicadores de hiperglicemia em humanos. (A)** IgE total (ng/ml) mensurada por ELISA. **(B)** Correlações médias com IgE total e **(C)** matrix de correlação de parâmetros clínicos de 60 pacientes obesos. Os parâmetros clínicos e bioquímicos foram obtidos dos indivíduos no momento do primeiro atendimento, prévio à realização de cirurgia bariátrica.



**Figura 20:** A obesidade associada ao DM2 altera a expressão de genes relacionados a resposta imune no jejuno. *Heat map* da expressão gênica de fatores de transcrição, citocinas e metabolitos no jejuno de pacientes obesos. A expressão gênica foi avaliada por qPCR em biópsias de jejuno. A expressão foi calculada baseada no gene *house keeping* (n=60).

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos, que camundongos com obesidade induzida por dieta apresentaram alterações metabólicas e imunológicas tais como hipertrofia do tecido adiposo, hiperglicemia, dislipidemia, aumento da permeabilidade intestinal, do número de células califormes e linfócitos intraepiteliais, e diminuição das células reguladoras nos linfonodos duodenais e jejunais. Essas alterações, no seu conjunto, sugerem que a obesidade induzida por dieta gera repercussões na mucosa intestinal, com prejuízo de fatores importantes na proteção da barreira epitelial e nas atividades reguladoras locais. Mostramos ainda que a tentativa de induzir tolerância oral em camundongos obesos falhou quando o antígeno foi administrado por gavagem. Isto demonstra que a suscetibilidade à indução dos mecanismos responsáveis pela tolerância oral está diminuída frente à obesidade.

A tolerância oral pode ser entendida como um mecanismo fisiológico de reatividade imunorreguladora aos antígenos presentes na dieta e da microbiota, desencadeado na mucosa intestinal, mas com repercussões sistêmicas já que ela envolve o controle da resposta celular e humoral em outros sítios do corpo específicas ao antígeno em questão (WEINER et al., 2011). Assim, a indução da tolerância oral depende de condições na mucosa intestinal (células Tregs, células dendríticas tolerogênicas e citocinas, por exemplo) e também é um importante mecanismo de manutenção da homeostase imune em um local constantemente desafiado pelo contato com antígenos.

Para tentar compreender o que resultou na falha da indução de tolerância oral, foi considerado alterações pertinentes na obesidade como a hiperglicemia e disbiose intestinal. Assim, mostramos que o tratamento da hiperglicemia com Metformina e o tratamento com antibióticos, que por sua vez, melhoraram a glicemia e permeabilidade, podem favorecer o desenvolvimento de tolerância oral em animais obesos.

Por outro lado, a quebra da tolerância oral, pode resultar em desenvolvimento de problemas inflamatórios no intestino, como as alergias alimentares. Assim, mostramos também que a alergia alimentar é mais severa em camundongos obesos quando comparados aos animais magros. Considerando os resultados apresentados em camundongos, foi investigado se estes achados poderiam ser translacionados humanos. Para isso, foram considerados parâmetros clínicos e bioquímicos, e a correlação desses fatores com os níveis séricos de IgE, anticorpo envolvido nas respostas alérgicas.

Primeiramente, observamos que indivíduos obesos com diabetes *melitus* tipo 2, apresentam níveis séricos mais elevados de IgE do que aqueles indivíduos com obesidade e sem hiperglicemia. Sendo assim, foi identificada correlação positiva entre os níveis de glicemia de jejum, hemoglobina glicada e IgE sérico, em indivíduos obesos. Além de alterações importantes na expressão genica na mucosa do jejuno como redução da expressão dos genes FOXP3 e IL-10 em indivíduos obesos com diabetes.

A obesidade é tida como um estado de inflamação crônica de baixo grau que se correlaciona com disfunções metabólicas e alterações na resposta imune, contribuindo para o desenvolvimento de processos inflamatórios na mucosa intestinal e aumento da suscetibilidade a doenças relacionadas à inflamação no intestino, como as alergias (DEVEREUX, 2006; KAU *et al.*, 2011; WINER *et al.*, 2016). Além disso, os efeitos metabólicos associados à obesidade como hiperglicemia e hiperlipidemia, podem ampliar a inflamação de modo a ser prejudicial à fisiologia organismo. A geração de produtos glicosados, por exemplo, leva à toxicidade pancreática e as complicações macro-vasculares e micro-vasculares, e podem afetar praticamente todos os órgãos, aumentando o risco de infecção e de mortalidade (BUTLER; BTAICHE; ALANIZ, 2005; LEITE *et al.*, 2010).

Thaiss e colaboradores identificaram que a hiperglicemia, e não o excesso de peso, pode interferir na homeostase intestinal e integridade epitelial. Na presença de hiperglicemia, ocorre aumento da permeabilidade intestinal, o que leva a um influxo anormal com disseminação sistêmica de produtos microbianos (THAISS *et al.*, 2018). Assim, uma das possibilidades que levantamos neste estudo, é que a obesidade associada à hiperglicemia afete as células epiteliais do intestino, resultando em alterações da barreira intestinal, aumento da permeabilidade, e contribuindo para o distúrbio da tolerância oral, observados em nossos experimentos. Além disso, outro aspecto associado à obesidade e ao aumento da permeabilidade intestinal é a disbiose, também observada nos animais obesos. A presença da disbiose pode favorecer o trânsito de bactérias ou de produtos bacterianos, como o LPS, pela barreira intestinal aumentando a inflamação e estimulando a ativação do sistema imune (AMAR *et al.*, 2011; CANI *et al.*, 2008).

Para compreender melhor o impacto da obesidade na mucosa intestinal, tentamos avaliar alguns fatores imunes importantes para a homeostase intestinal e para o desenvolvimento da tolerância oral, que poderiam estar comprometidos. Como, frequência de linfócitos intraepiteliais (IEL), produção de IgA e frequência de células reguladoras, que serão discutidos adiante.

Conforme mostrado em trabalhos anteriores, a frequência de IEL é maior em humanos obesos sem ou com diabetes quando comparados com pessoas eutróficas (MONTEIRO-SEPULVEDA *et al.*, 2015). Os IELs exibem características de imunidade inata e adaptativa (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011) e parecem fornecer proteção imune imediata para evitar a disseminação de patógenos. Além disso, devido à sua proximidade às células epiteliais intestinais, apresentam funções reguladoras e evitam respostas imunes inflamatórias excessivas que podem comprometer a integridade da barreira intestinal. A dieta e os metabólitos da microbiota parecem ser estimulantes importantes para a atividade dos IELs, pois a quantidade de IEL é reduzida na mucosa intestinal de camundongos alimentados com dieta contendo aminoácidos livres (DA SILVA MENEZES *et al.*, 2003). Sugerindo a necessidade de sinais do lúmen para o desenvolvimento e/ou manutenção dessas células. No entanto, o excesso da capacidade citotóxica dos IELs pode induzir distúrbios inflamatórios, como doença celíaca e doenças inflamatórias intestinais. Infecções por bactérias patogênicas ou protozoários também induzem alterações na resposta das IELs, mudando rapidamente o padrão de movimento entre as células epiteliais intestinais (FARIA, ANA M.C.; REIS; MUCIDA, 2017; HOYTEMA VAN KONIJNENBURG *et al.*, 2017). A maioria dos IELs tem grânulos citoplasmáticos abundantes para atividade citotóxica e podem expressar citocinas efetoras, como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 ou IL-17 (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011). Assim, no contexto da obesidade, o aumento do número de IEL pode estar correlacionado com maior ocorrência de estímulos devido ao aumento da permeabilidade intestinal, favorecendo o contato com antígenos dietéticos e com bactérias presentes no lúmen intestinal.

Já as alterações resultantes do aumento de sIgA, e maior frequência de bactérias ligadas a IgA em camundongos obesos, ainda não está claro. Estudos em humanos mostraram que indivíduos obesos apresentam níveis elevados de IgA sérica, entretanto, o aumento dos níveis de IgA sérica nesses estudos está associado a infecções ou oxidação aumentada de LDL (LUCK *et al.*, 2019; VEHKALA *et al.*, 2013). Alguns pesquisadores associam a elevação dos níveis de sIgA com maior contato com bactérias patogênicas presentes no lúmen intestinal (LUCK *et al.*, 2019). sIgA regula a microbiota e auxilia na manutenção da homeostase intestinal protegendo contra a ação de organismos invasores, como bactérias patogênicas. Embora sIgA também desempenhe um papel na resistência do hospedeiro a infecções, camundongos livres de patógenos específicos (SPF)

apresentaram concentrações abundantes de sIgA, enquanto camundongos livres de germe não, sugerindo que o papel principal da sIgA é manter o equilíbrio entre o hospedeiro e sua microbiota (CONG, YINGZI *et al.*, 2009). No lúmen intestinal, a IgA se liga a microrganismos e toxinas, neutralizando sua ação e dificultando a translocação. Nesse contexto, o aumento dos níveis de sIgA e de bactérias revestidas por IgA no modelo de obesidade aqui utilizado, pode estar associado a alterações na microbiota intestinal. Luck e colaboradores também identificaram um aumento no percentual de bactérias ligadas a sIgA em condições de obesidade, e mostraram que a IgA possui alta afinidade para as bactérias tanto no cólon como no intestino delgado (LUCK *et al.*, 2019). Assim, esses resultados sugerem que, na obesidade induzida por dieta, a IgA responde ao aumento de espécies microbianas patogênicas e com capacidade de translocação no intestino.

Outra alteração observada nos animais obesos, foi a redução da frequência de células T reguladoras nos linfonodos mesentéricos que drenam o duodeno e o jejuno. Os principais mecanismos subjacentes às ações das células Treg incluem a produção de citocinas inibitórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  e o controle da proliferação de células efectoras (CAO *et al.*, 2007). A população de células Treg envolvidas na indução de tolerância oral é heterogênea, e a geração dessas células depende das citocinas e dos metabólitos presentes no meio em que estas células se encontram. Estudos anteriores mostraram que a presença de TGF- $\beta$  e ácido retinóico (RA) induz a diferenciação de células T naive em células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (COOMBES *et al.*, 2007a). Na mucosa intestinal a diferenciação de uma célula T *naive* em uma célula Treg induzida (iTregs) ocorre nos linfonodos que drenam as diferentes porções do intestino. Worbs e colaboradores mostraram que os linfonodos presentes na mucosa intestinal drenam diferentes segmentos do intestino de acordo com a posição anatômica (WORBS *et al.*, 2006c). Já Esterhazy *et al.*, (2019) avaliou o perfil de células imunes nos linfonodos que drenam intestino e observou redução da frequência de células Foxp3<sup>+</sup> e CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> dos linfonodos proximais para os distais (duodeno – cólon). Já a frequência das células ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> decrescem dos linfonodos de forma proximal-distal também em condições homeostase (ESTERHÁZY, D ET AL., 2019). Além disso, os linfonodos duodenais e jejunais também apresentam maior concentração de ALDH2 e ácido retinóico, quando comparados aos linfonodos mais distais. A soma destes fatores confere aos linfonodos proximais características tolerogênicas (ESTERHÁZY, D ET AL., 2019), enquanto os distais apresentam características maiores de controle de infecções. Nesse grande cenário, nós conseguimos

mostrar que camundongos obesos apresentam redução na frequência de Tregs nos linfonodos duodenais e jejunais quando comparados com camundongos magros controle, o que pode ser um dos fatores que contribuiu para quebra da homeostase intestinal e pode contribuir para a falha no desenvolvimento de tolerância oral.

Além das células Tregs, as células dendríticas também são importantes para a manutenção da homeostase intestinal e para indução de tolerância oral. Na mucosa intestinal de camundongos e humanos, as células dendríticas CD103<sup>+</sup> expressam níveis elevados da enzima RALDH2 (*Aldh1a2* mRNA) capaz de metabolizar vitamina A em ácido retinóico (AR) além de secretarem TGF- $\beta$ . A apresentação de antígenos derivados do lúmen do intestino por essas células a linfócitos TCD4<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos converte esses linfócitos (naive) em células T Foxp3<sup>+</sup> com capacidade reguladora (Treg) (COOMBES et al, 2007). A secreção de AR pelas DCs CD103<sup>+</sup> também é essencial para a produção de sIgA na mucosa intestinal em conjunto com outros mediadores tais como TGF- $\beta$ , 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<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> dos linfonodos mesentéricos são aquelas que apresentam a maior expressão 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 por via oral (ESTERHAZY et al, 2016). Esse mesmo grupo mostrou que a drenagem linfática específica do segmento intestinal ocorre de forma compartimentada e influencia as células imunes nos LNMs, particularmente as DCs migratórias MHCII<sup>hi</sup> CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> estão envolvidas na resposta tolerogênica e as CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> estão relacionadas com resposta pró-inflamatórias (ESTERHÁZY *et al.* 2018). As DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (cDC1) são mais frequentes nos LNMs duodenais apresentando uma assinatura mais tolerogênica e com redução da expressão de receptores de citocinas inflamatórias tais como IFN- $\gamma$  e/ou IL-1 $\beta$  quando comparado às células dos linfonodos que drenam o jejuno, o íleo, o cécum e o cólon (ESTERHÁZY *et al.* 2018). Esses achados sugerem os linfonodos duodenais são ambientes tolerogênicos devido à assinatura de DCs favoráveis e à drenagem preferencial de nutrientes para esses linfonodos. Assim, foi observado que camundongos alimentados com dieta HSB apresentaram redução na frequência das DCs CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos (LNMs). No entanto, esse fato não foi analisado de forma

compartimentalizada, mas se correlaciona com os dados que obtivemos de redução da frequência de Treg nos linfonodos duodenais. Seria interessante avaliar, a partir desses resultados preliminares, se a frequência dessas células está modificada também nos diferentes linfonodos, principalmente nos duodenais, de camundongos obesos.

A exposição à grande quantidade de antígenos da dieta e da microbiota comensal exige um equilíbrio intenso da resposta imune na mucosa intestinal, pois a ativação não controlada direcionada a microbiota pode 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). Nesse cenário, o desencadeamento de resposta imune tolerogênica subsequente à ingestão do antígeno favorece a manutenção da homeostase intestinal, e pode atenuar respostas imunes inflamatórias e deletérias ao organismo de modo a controlar diversas doenças inflamatórias, inclusive a obesidade.

Dentre os vários fatores que podem interferir na indução da tolerância oral, temos a idade, tanto camundongos neonatos, como os senescentes são resistentes à indução de tolerância oral (FARIA *et al.*, 1998; SPEZIALI *et al.*, 2018; VAZ *et al.*, 1997). No entanto, o perfil nutricional como a obesidade ou a desnutrição, ainda não foram explorados como fatores que interferem na indução de tolerância oral. Mas, é claro que o comprometimento nutricional como a obesidade leva a alterações na homeostase da mucosa intestinal, comprometendo o desenvolvimento da tolerância oral. Assim, após identificar as alterações metabólicas e na homeostase intestinal em camundongos obesos, perguntamos se estas alterações poderiam de fato, interferir na indução de tolerância oral

Para esse fim, administramos uma única dose de OVA por via intra-gástrica. No entanto, os camundongos obesos não desenvolveram tolerância oral, conforme verificado pela manutenção de níveis elevados de IgG1 anti-OVA e IgE total. A inibição específica de IgG1 é uma forma muito sensível de suscetibilidade à tolerância oral, uma vez que este isotipo de imunoglobulina é o mais difícil de inibir por administração oral de antígenos (REZENDE *et al.*, 2013; WORBS *et al.*, 2006a).

Estudos prévios abordaram uma dicotomia na susceptibilidade de subtipos de linfócitos T auxiliares à indução de tolerância oral, onde havia ativação preferencial de células Th2 e consequente produção de citocinas, como IL-4 e IL-10 após o contato com o antígeno, e supressão das respostas Th1 (MILLER *et al.*, 1992; MILLER *et al.*, 1994).



Adicionalmente, a produção de anticorpos IgG1, dependente de IL-4, seria mais resistente à diminuição frente a tolerância, do que a secreção de IgG2a, dependente de IFN- $\gamma$  (MELAMED e FRIEDMAN, 1994; CLAESSEN, VON BLOMBERG et al., 1996). No entanto, estudos subsequentes sugerem que ambas as respostas, Th1 e Th2, possam ser suprimidas durante a indução de tolerância oral (GARSIDE et al., 1995). 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 a reatividade pulmonar, fenômenos típicos do envolvimento de linfócitos Th2, e que levam ao desenvolvimento da asma (RUSSO et al., 1998). 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)<sub>3</sub> (VAZ et al., 1997).

Outro mecanismo crucial de indução de tolerância oral é a produção de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10 por células T reguladoras induzidas (iTreg) na mucosa intestinal por meio da administração oral de antígenos (MENGEL *et al.*, 1995; SPEZIALI *et al.*, 2018; VAZ *et al.*, 1997; LUCK *et al.*, 2019). Mucida e colaboradores mostraram que a falha no desenvolvimento das iTregs e o bloqueio da ação do TGF- $\beta$  comprometem o desenvolvimento da tolerância oral (MUCIDA *et al.*, 2005a). Ao verificar a produção de TGF- $\beta$ , observamos aumento apenas no sobrenadante de cultura de células de baço dos animais controles magros que receberam o antígeno por via oral, diferente dos obesos. que não apresentaram diferença nos níveis de TGF- $\beta$  em sobrenadantes de cultura de células de baço. O tratamento com anticorpo anti-TGF- $\beta$  antes, durante e imediatamente após a administração oral de OVA reverte a supressão da inflamação de vias aéreas, mostrando a importância dessa citocina para a indução de tolerância oral (MUCIDA et al., 2005; FARIA; WEINER, 2006b). Assim, a falha das células do baço dos animais obesos em aumentar a produção de TGF- $\beta$  também pode ser um aspecto importante da dificuldade em induzir tolerância oral nesse grupo.

Outra alteração na resposta celular identificada nos camundongos obesos, foi o aumento na concentração de IFN- $\gamma$  no sobrenadante, tanto de cultura de células de baço quanto de linfonodos mesentéricos dos animais tratados previamente com OVA. Estudos prévios mostraram que a obesidade induzida por dieta promove mudança nas populações de células imunes na lâmina própria intestinal para um padrão inflamatório caracterizado pela redução de células Treg FOXP3<sup>+</sup>, aumento de células Th1 e de células TCD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (LUCK *et al.*, 2015). Altas concentrações de IFN- $\gamma$  tem efeitos deletérios na barreira intestinal, induzindo a redução ou a dissociação de proteínas das junções firmes, como zonulina (ZO-1) e ocludina (BEAUREPAIRE; SMYTH; MCKAY, 2009). De acordo com Luck e colaboradores, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  alimentados com dieta hipercalórica preservam a permeabilidade intestinal, sugerindo que as células secretoras de IFN- $\gamma$  são pelo menos parcialmente responsáveis pelo aumento da permeabilidade intestinal em camundongos obesos (LUCK *et al.*, 2015). Como não houve redução na concentração de IFN- $\gamma$  nas culturas de células de baço e de MLNs de camundongos obesos que receberam OVA, e sim aumento, podemos sugerir que o contato prévio com OVA pode ter atuado como indutor para a diferenciação de células secretoras de IFN- $\gamma$ , ou seja, um processo semelhante ao de imunização oral. Porém, outros parâmetros deveriam ser avaliados, como frequência de células secretoras de IFN- $\gamma$  na mucosa intestinal, manutenção de células secretoras de IFN- $\gamma$  em órgãos linfoides e na mucosa intestinal, para confirmar essa hipótese.

Como dito anteriormente, 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.*, 2006b). 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 (CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>) também podem exercer o papel de iTregs ou ainda promover o desenvolvimento de células iTregs Foxp3<sup>+</sup> via produção de TGF- $\beta$ . Para que a tolerância oral seja estabelecida, é necessário que DCs que expressam a integrina  $\alpha 4\beta 7$  (CD103) migrem da lâmina própria carregando antígeno para os LNMs onde auxiliam na diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> *naive* em células TCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (WORBS *et al.*, 2006).

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 tolerância oral em animais obesos tratados com OVA por gavagem, é a não geração de células Tregs nos LNMs. Nos camundongos que receberam a dieta controle AIN93G e a OVA por via oral, a frequência das células Tregs CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, foi aumentada. Já nos animais obesos, não foi observada diferença na frequência células Tregs CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos LNMs após a administração oral de OVA. Assim, em animais obesos, há menor frequência dessas células nos LNMs antes, e após o tratamento oral com o antígeno. Sendo assim, a dificuldade em aumentar a diferenciação de iTregs pode ser um outro fator que contribui para a falha na indução de tolerância oral em camundongos obesos.

Um fator que pode importante para a diferenciação das células Tregs em animais obesos é o aumento da secreção de adipocinas pelo tecido adiposo. Estudo prévio do nosso grupo realizado mostrou que camundongos com obesidade induzida por dieta HSB tem aumento na secreção de resistina e leptina, e redução da secreção de adiponectina, com redução de Tregs no tecido adiposo e em LNMs dos camundongos obesos (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 (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Por outro lado, camundongos deficientes em leptina (*ob/ob*) ou em seu receptor (*db/db*) apresentam maior proliferação de células Tregs e Th17 (CAO *et al.*, 2007; DE ROSA *et al.*, 2007; MORAES-VIEIRA *et al.*, 2014). 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. Schmetterer e colaboradores mostraram que a expressão do receptor de leptina por linfócitos T CD4<sup>+</sup> em camundongos obesos participa na sinalização, via STAT3, para a diferenciação para células Th17 (SCHMETTERER; PICKL, 2017). Como a diferenciação de Th17 e Tregs Foxp3<sup>+</sup> se regulam pela expressão diferencial de RORγt 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<sup>+</sup>. 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 consequentemente na susceptibilidade a indução de tolerância oral.

As Tregs CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> são também importantes para manter a resposta imune tolerante à microbiota intestinal, como por exemplo, auxiliar a manutenção de células B produtoras de IgA via TGF- $\beta$  na *lamina própria* (CONG, Y. *et al.*, 2009). Porém, estão reduzidas em condições de alterações da barreira intestinal e disbiose, em casos de obesidade induzida por dieta (LUCK *et al.*, 2015). Um número crescente de evidências conecta a disbiose bacteriana com a obesidade, a intolerância à glicose e às doenças intestinais (TURNBAUGH *et al.*, 2006b).

Em camundongos, a análise da microbiota mostrou que a maioria das bactérias no intestino 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 pertencentes aos dois filos. No entanto, em camundongos obesos há alteração na proporção entre esses filos (TURNBAUGH *et al.*, 2006a). Em nossos experimentos em camundongos obesos, observamos redução da variabilidade e alterações na proporção de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* na microbiota intestinal quando comparados aos camundongos controle magros. Moreira e colaboradores em 2019 já haviam mostrado resultados semelhantes quando compararam a diversidade da microbiota de animais tratados com HSB ou AIN93G (MOREIRA JÚNIOR *et al.*, 2019).

Em condições de obesidade a disbiose intestinal em camundongos está associada ao aumento da permeabilidade intestinal, o que pode favorecer a passagem de bactérias ou de produtos bacterianos, como o LPS, através da barreira intestinal aumentando a inflamação e estimulando a ativação do sistema imune de maneira sistêmica (AMAR *et al.*, 2011; CANI *et al.*, 2008). Em humanos a disbiose da microbiota intestinal também está associada com aumento da concentração sérica de LPS (WANG, J. *et al.*, 2019). Mudanças significativas na microbiota comensal também foram observadas em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (Karlsson *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2012). Os níveis séricos de LPS aumentam como resultado de DM2, indicando que pode haver aumento da translocação de produtos bacterianos em modelos murinos (AMAR *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que as mudanças da microbiota, resulta em disfunções metabólicas como hiperglicemia e ganho de peso corporal, e estas alterações podem ser transferíveis, uma vez que a microbiota de camundongos geneticamente obesos leva ao aumento da adiposidade entre companheiros saudáveis na mesma gaiola (TURNBAUGH

*et al.*, 2006a). Assim, a transferência da microbiota pode ser suficiente para favorecer suscetibilidade à síndrome metabólica (CARVALHO *et al.*, 2012).

Além da microbiota ser importante no equilíbrio metabólico, os produtos derivados do metabolismo dessas bactérias também estão envolvidos na resposta imune intestinal. Os ácidos graxos de cadeia curta, produzidos por bactérias intestinais, se ligam aos seus receptores específicos nos linfócitos e nas células apresentadoras de antígenos aumentando a capacidade tolerogênica dessas células e diminuindo a resposta alérgica aos antígenos da dieta (TAN *et al.*, 2016). No entanto, a tolerância à microbiota é localizada no intestino e a ausência de microbiota, como em animais *germ free*, não impede a indução de tolerância oral (WALTON *et al.*, 2006).

Diante da importância da microbiota para a homeostase intestinal e para a indução de tolerância a antígenos da dieta, resolvemos investigar o papel da microbiota na falha do desenvolvimento da tolerância oral nos camundongos obesos. Para isso foram realizados dois métodos, a transferência fecal e o tratamento com antibióticos. A transferência fecal do animal controle magro para o animal obeso auxiliou na diminuição da glicemia de jejum. No entanto, não foi capaz de melhorar a permeabilidade intestinal e a capacidade de desenvolver tolerância oral nos animais obesos. Já o tratamento com antibióticos, além de reduzir a permeabilidade intestinal, permitiu que os animais obesos desenvolvessem a tolerância oral. Azad e colegas mostraram associações entre a microbiota intestinal e a sensibilização alimentar em crianças no primeiro ano. Crianças com sensibilização alimentar até o primeiro ano de vida apresentaram menor riqueza geral da microbiota intestinal nos 3 primeiros meses. Além disso, houve diferença entre as famílias de *Enterobacteriaceae* foi mais abundante e *Bacteroidaceae* menos abundante em crianças sensibilizadas (HAYGLASS *et al.*, [S.d.]). Estes resultados mostram a interferência da microbiota intestinal na sensibilização de crianças até um ano de idade, podendo até mesmo ser utilizado como um predito de doenças intestinal, incluindo alergias.

Diante da importância da microbiota para a homeostase intestinal e na tolerância a antígenos da dieta, resolveu investigar a interferência dessa na indução de tolerância oral. Apesar dos inúmeros estudos empregando o transplante de microbiota, tratamento com antibióticos ou ainda laxantes em modelos animais, os métodos são bastante debatidos e não há consenso científico sobre a melhor metodologia. Assim, foi realizado dois métodos para avaliar o papel da microbiota sendo eles a transferência fecal e o tratamento com

antibiótico. A transferência fecal de um animal controle magro para um animal obeso, auxiliou na melhora da glicemia de jejum, no entanto não foi capaz de melhorar a permeabilidade intestinal e a capacidade de desenvolver tolerância oral.

Portanto, observa-se que a microbiota intestinal é importante no controle metabólico do organismo e no desenvolvimento de resposta imune tolerogênica, mas não é fundamental na indução de tolerância oral.

Apesar dos inúmeros estudos empregando o transplante de microbiota, o tratamento com antibióticos, ou ainda o tratamento com laxantes em modelos animais, os métodos são bastante debatidos e não há consenso científico sobre a melhor metodologia. Muitos estudos usam roedores livres de germes (GF) para transferência de microbiota (ZIĘTAK *et al.*, 2016), enquanto outros usam animais criados de forma convencional com ou sem depleção de microbiota antes da transferência (GREGORY *et al.*, 2015). Por último, a frequência e a duração do inóculo variam de uma única administração a várias vezes por semana, durante algumas semanas (FERRERE *et al.*, 2017; HINTZE *et al.*, 2014; WRZOSEK *et al.*, 2018). A transferência fecal influencia o ecossistema da microbiota, no entanto, fatores como idade, tratamento prévio a transferência, estado microbiológico (disbiose) e dieta também pode intervir no processo (LE ROY *et al.*, 2019). Estudos anteriores que avaliaram a colonização da microbiota após transplante fecal, mostraram resistência à colonização de algumas espécies de bactérias tanto em camundongos como em humanos (SUEZ *et al.*, 2018). Assim, para melhor entendimento do processo seria necessário avaliar a eficácia da estratégia experimental avaliando a proporção bacteriana do inóculo em recipientes, e a abundância relativa bacteriana nos recipientes, para averiguar a semelhança ao inóculo, e a remoção da proporção bacteriana endógena do recipiente.

Por outro lado, o tratamento com antibióticos por gavagem no período de 17 a 24 dias proporciona eliminação total da população bacteriana intestinal, e esse tratamento resulta em alterações estruturais e celulares que se aproximam de animais livres de germes, como órgãos linfóides secundários hipoplásicos, ceco dilatado e reduzida renovação celular epitelial (REIKVAM *et al.*, 2011). Camundongos obesos que receberam antibiótico tiveram redução da adiposidade, da inflamação no tecido adiposo, do metabolismo da glicose e da permeabilidade intestinal ao considerar parâmetros como a expressão de proteínas de junções, como ocludinas e claudinas (CANI *et al.*, 2008). Nós observamos resultados semelhantes quando tratamos animais obesos com antibiótico,

pela melhora do metabolismo de glicose, da permeabilidade intestinal e da capacidade de desenvolver tolerância oral, quando comparados com camundongos obesos não tratados.

Por outro lado, um estudo, identificou que o tratamento com antibióticos por gavagem no período de 17 a 24 dias proporciona eliminação total da microbiota intestinal, e que esse tratamento resulta em alterações estruturais e celulares que se aproximam de animais livres de germes, como órgãos linfóides secundários hipoplásicos, ceco dilatado e reduzido renovação da célula epitelial (REIKVAM *et al.*, 2011). Já Cani e colaboradores mostraram que o tratamento com antibióticos em camundongos obesos reduziu a adiposidade, a inflamação no tecido adiposo, melhorou o metabolismo da glicose e permeabilidade intestinal ao considerar parâmetros como a expressão de proteínas de junções, como ocludinas e claudinas (CANI *et al.*, 2008). Resultado similar foi observado nos animais obesos tratados com antibiótico que apresentaram melhora do metabolismo de glicose, permeabilidade intestinal e ainda foram capazes de desenvolver tolerância oral quando comparados com camundongos obesos não tratados. Assim, parece que o desenvolvimento de tolerância oral foi dependente não necessariamente da microbiota intestinal, mas da melhora do metabolismo de glicose e da permeabilidade intestinal.

Nosso grupo mostrou recentemente que alterações na mucosa intestinal de camundongos diabéticos não obesos (NOD) precede o desenvolvimento espontâneo de *diabetes* tipo 1. Nesse estudo identificamos que camundongos NOD apresentavam disbiose, níveis reduzidos de produção de muco e frequência alterada de células dendríticas e Tregs nos linfonodos mesentéricos. Essas alterações precoces nos componentes do intestino detectadas de camundongos NOD resultaram em falha na indução de tolerância oral (MIRANDA *et al.*, 2019). Fazendo um paralelo, vimos alterações similares em animais obesos com hiperglicemia na frequência de células dendríticas nos linfonodos mesentéricos totais, e das células Tregs CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> nos linfonodos drenantes do duodeno e do jejuno. Assim, decidimos avaliar se a hiperglicemia poderia interferir na indução de tolerância oral, e para isso, realizamos dois experimentos.

No primeiro foi realizado o tratamento com estreptozotocina (STZ), que destrói células B pancreáticas, simulando o modelo de *diabetes* tipo I. Após o tratamento, os animais foram submetidos ao protocolo de indução de tolerância oral, o qual foram refratários. Além disso, foi realizado o tratamento com Metformina, para reduzir a glicemia em camundongos obesos com *diabetes* tipo 2. Os resultados obtidos apontaram que a hiperglicemia, e não o excesso de peso poderia estar comprometendo a homeostase

intestinal e conseqüentemente a indução de tolerância. Isso porque após o tratamento, com Metformina os camundongos obesos apresentaram níveis de glicose abaixo de 200mg/dL, e houve diminuição da permeabilidade intestinal e desenvolvimento da tolerância oral. Também, os resultados do experimento com STZ, mostraram que a hiperglicemia teve correlação direta com o aumento da permeabilidade intestinal e não houve indução de tolerância oral.

A alta concentração sérica de glicose pode afetar as células epiteliais intestinais, podendo resultar em alterações da função de barreira, aumento da permeabilidade intestinal, risco de infecção entérica e disbiose (THAISS *et al.*, 2018). Em humanos, a presença de síndrome metabólica pode favorecer o agravamento de infecções intestinais (MULLER *et al.*, 2005). Além disso, a ligação destacada entre a hiperglicemia e o desenvolvimento de tolerância oral pode fornecer uma base de provável mecanismo para uma variedade de doenças causadas pela inflamação intestinal aumentada, e a alergias alimentares.

Fatores ambientais e estilo de vida podem contribuir para a quebra do estado de tolerância e para o desenvolvimento de alergias (SAURER; MUELLER, 2009; SICHERER; SAMPSON, 2010). No contexto deste trabalho, a falha na indução da tolerância oral está associada a alterações no metabolismo e no perfil das células imunes da mucosa intestinal. Esses fatores podem estar correlacionados ao acometimento da alergia alimentar. Assim, para esclarecer se a quebra da tolerância oral a antígenos da dieta em animais obesos poderia favorecer o desenvolvimento de alergia alimentar, foi realizado o protocolo de indução de alergia alimentar a OVA. Os resultados mostraram que os animais obesos desenvolveram alergia alimentar de forma mais grave quando comparados aos animais controle, ao considerar parâmetros como concentrações séricas de IgG1 específica, permeabilidade vascular e variação de peso.

A absorção do alérgeno através do epitélio intestinal e o acesso às células efetoras presentes na mucosa estão aumentados em pessoas com alergia alimentar (PERRIER; CORTHÉSY, 2011). O aumento da permeabilidade intestinal favorece a exposição de proteínas intactas alergênicas que podem levar à sensibilização (GROSCWITZ; HOGAN, 2009). O aumento da permeabilidade em indivíduos alérgicos, somados ao aumento da permeabilidade em condições de obesidade pode ser um dos fatores que favoreceu a maior severidade da alergia. Já a perda de peso presente na alergia alimentar experimental está associada ao aumento da lipólise e inflamação no tecido adiposo, com aumento do



número de macrófagos e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL -6 e CCL2, e não a redução da ingestão alimentar (DOURADO *et al.*, 2011).

Outra alteração observada foi a presença de anafilaxia cutânea passiva (PCA). A anafilaxia é uma consequência da alergia alimentar que pode ser fatal, e seus mecanismos envolvem a degranulação de mastócitos e liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e citocinas, e histamina e proteínas vasoativas após a ligação do complexo antígeno-IgE aos receptores de alta afinidade IgE (Fc $\epsilon$ RI) na superfície de mastócitos (GALLI; TSAI, 2016). Observamos que camundongos obesos previamente sensibilizados e desafiados por via oral apresentaram maior área de extravasamento durante a PCA do que camundongos não-obesos. Estudos anteriores mostraram que a anafilaxia sistêmica em camundongos pode ser mediada por IgE e IgG1 antígeno-específicas ligadas aos receptores Fc $\gamma$ RIII na superfícies de mastócitos, com consequente redução da temperatura corporal e aumento do extravasamento de azul de Evans em PCA (WANG, Z. *et al.*, 2013). Assim, podemos considerar que o aumento dos níveis de anticorpos séricos em camundongos obesos está associado ao aumento do extravasamento de azul de Evans durante a PCA.

Curiosamente os níveis de IgE em animais obesos aumentaram já no desafio com OVA, mesmo sem a imunização, diferente do observado em animais magros. Estudos anteriores mostraram correlação positiva entre obesidade, sintomas alérgicos e níveis séricos elevados de IgE em crianças e adultos (HUANG; SHIAO; CHOU, 1999; JULIA; MACIA; DOMBROWICZ, 2015; VISNESS *et al.*, 2009; WANG, H. *et al.*, 2017). Além disso, outro estudo realizado com 8.856 adultos na China mostrou que indivíduos pré-diabéticos apresentaram correlação positiva entre níveis elevados de glicemia de jejum e IgE (WANG, H. *et al.*, 2017). Como não observamos diferença no título de IgE entre os animais obesos sensibilizados ou não, frente ao desafio oral com OVA, sugerimos que na obesidade a produção de IgE é estimulada já pela ingestão do alérgeno, mesmo sem haver sensibilização. Neste estudo não avaliamos a produção de IL-4 nem de IL-33, porém foi demonstrado recentemente que a obesidade aumentou a susceptibilidade à alergia alimentar por aumentar a diferenciação de células Th2 e a expressão de IL-33(GU *et al.*, 2021).

A IgE é uma medida diagnóstica comum na prática clínica para diagnóstico de alergias e pode ser influenciada por uma série de fatores modificáveis e não modificáveis, dentre eles sexo, idade, tabagismo e etilismo (BARBEE *et al.*, 1981). Além disso, o

aumento das concentrações totais de IgE no soro tem sido relatado também em uma série de doenças não alérgicas em humanos (GALLI; TSAI, 2016).

Para tentar fazer a translação dos nossos achados em camundongos com a clínica, avaliamos se existia alguma correlação da produção de IgE, com a obesidade e a hiperglicemia. Para isso, foi feita a medida da IgE sérica em uma coorte de indivíduos obesos, segregados entre obesos sem hiperglicemia e obesos com DM2. Os resultados mostraram níveis mais elevados de IgE total em pacientes obesos com DM2, quando comparados com pacientes obesos sem diabetes.

A síndrome metabólica foi associada ao aumento do IgE na população coreana (KIM *et al.*, 2018). Nessa população, também foi feita associação da concentração sérica de IgE com componentes da síndrome metabólica, como obesidade central, hiperglicemia, hipertensão e triglicerídeos no soro. Em contraste, os níveis de colesterol HDL foram negativamente associados ao IgE (KIM *et al.*, 2018). Da mesma forma, tem sido mostrado aumento da IgE sérica em pacientes com diabetes e pré-diabetes em comparação aos indivíduos normoglicêmicos (WANG, Z. *et al.*, 2013). Sendo assim, após análise de correlação da IgE sérica com demais parâmetros, metabólicos e clínicos, identificamos também associação positiva entre a IgE plasmática e fatores como hemoglobina glicada, leptina e triglicerídeos.

O mecanismo pelo qual as alterações metabólicas influenciam nas concentrações de IgE ou vice-versa ainda é desconhecida, muito se discute sobre as alterações nas concentrações de citocinas e na frequência de células Th2, porém isso ainda não está claro.

Considerando a leptina como fator que poderia explicar essa associação entre IgE e metabolismo, sabe-se que esse hormônio pode atuar nas células T diminuindo a sinalização para a proliferação de células Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> em humanos (TALEB *et al.*, 2007). Em células humanas, a expressão de Foxp3<sup>+</sup> foi significativamente aumentada quando culturas de linfócitos receberam anticorpo anti-leptina após estimulação com anti-CD3 e anti-CD28 (DE ROSA *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou que camundongos com asma experimental induzida por OVA, e que receberam também leptina, aumentaram as concentrações plasmáticas de IgE total e a gravidade da asma (SHORE *et al.*, 2005). Esses dados em conjunto sugerem que a leptina pode ser o elo que correlaciona a obesidade com a IgE e consequentemente com a susceptibilidade aumentada às alergias.

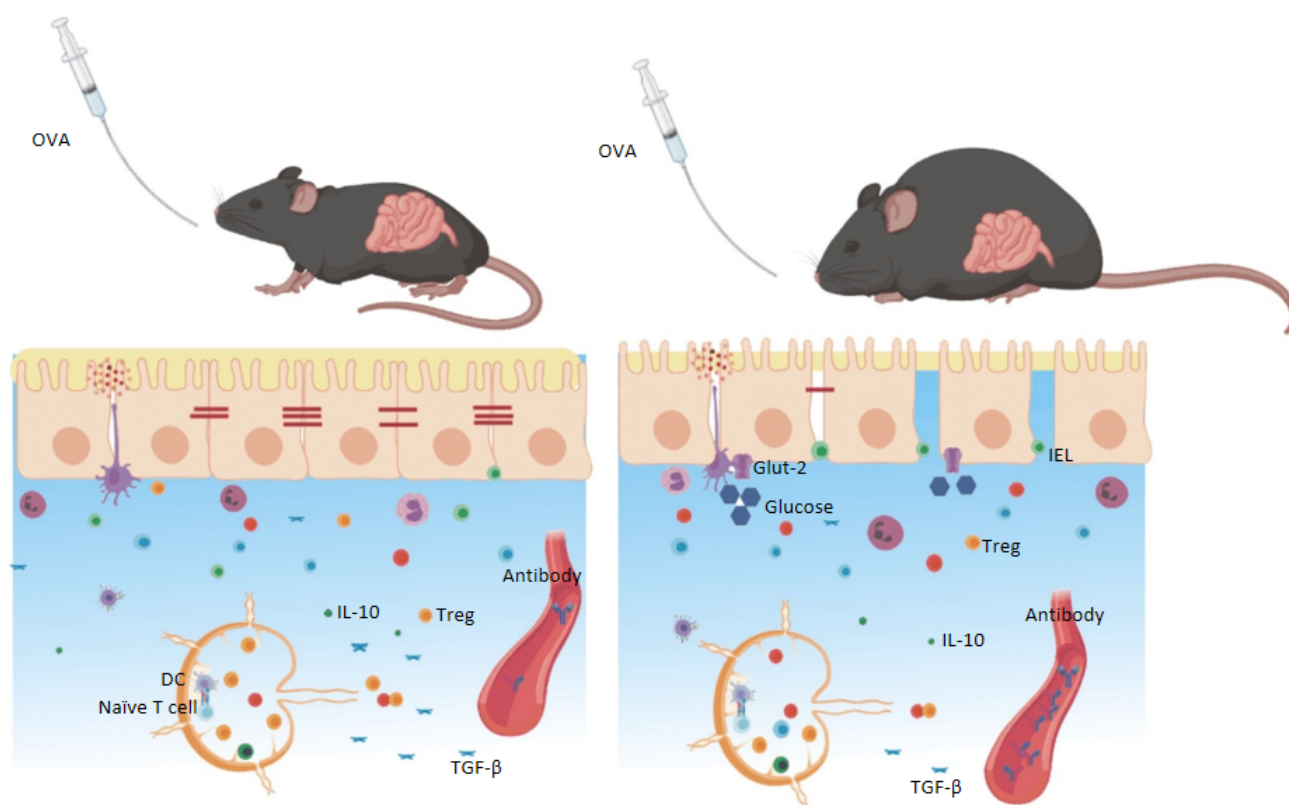
Além da associação da IgE plasmática com variáveis metabólicas, foi avaliada também a expressão de genes associados à homeostase intestinal em biopsias de jejuno de pacientes obesos sem alterações no metabolismo da glicose, em comparação com obesos com intolerância à glicose e/ou DM2. Os genes selecionados estão predominantemente envolvidos em vias metabólicas, resposta imune e manutenção da barreira epitelial (DALMAS et al., 2014, FARIA, A. M. C.; WEINER, 2005).

Os resultados encontrados mostraram que a expressão de RNAm para IL-10, IL22, Foxp3, claudina e ZO1 estavam reduzidas nos indivíduos obesos com DM2, comparados aos obesos sem DM2. É importante ressaltar que esses genes são importantes para expressão de proteínas responsáveis pela manutenção da integridade intestinal e pela indução da tolerância oral. Os principais mecanismos subjacentes às ações das células Foxp3 incluem a produção de citocinas inibitórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (CAO et al., 2007). Já a IL-22 está associada à integridade da barreira intestinal, regula o metabolismo de lipídios e glicose, e contribui para a imunidade da mucosa em camundongos diabéticos (WANG, X. et al., 2014). Em um intestino saudável, o ambiente regulado observa-se a produção constante de proteínas das *tight junctions*, como ZO-1 e claudina 2, que são essenciais para a integridade intestinal. A diminuição da expressão desses genes em humanos obesos sugere alterações na homeostase intestinal com possível quebra da tolerância imunológica e do equilíbrio da resposta imune intestinal.

Por outro lado, a expressão do RNAm para as citocinas IL-33 e IL-5 estava aumentado da no jejuno dos pacientes obesos com DM2, quando comparados a indivíduos obesos. A IL-33 foi identificada como mediadora de doenças inflamatórias, como asma, doenças cardiovasculares e alérgicas. Além disso, é produzida por células de epitélio intestinal mediante dano, atuando como uma alarmina (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016). A interleucina 5 (IL-5), por outro lado, tem um papel na ativação, diferenciação e crescimento de eosinófilos em locais de inflamação. Em condições alérgicas, os eosinófilos amadurecem sob a influência de IL-5 e modulam reações imunes (E KALI S. THOMAS, 2017). Juntos, esses dados sugerem que, de forma semelhante aos achados em camundongos, a obesidade associada à hiperglicemia pode estar favorecendo a ocorrência de alergia.

## 5. CONCLUSÃO

A obesidade induzida por dieta é capaz quebrar a homeostase intestinal, e essa quebra da homeostase dificulta a indução de tolerância oral e aumenta a susceptibilidade à alergia alimentar. A resistência em desenvolver tolerância oral está mais relacionada à hiperglicemia, e não ao excesso de peso. Humanos obesos com DM2 tem produção aumentada de IgE e podem estar mais susceptíveis ao desenvolvimento de sintomas alérgicos mediados por IgE. Portanto, a obesidade leva a resistência ao desenvolvimento da tolerância oral e ao aumento da susceptibilidade à alergias (Fig. 21).



**Figura 21: A obesidade compromete a indução de tolerância oral e agrava a reação alérgica.** A obesidade induzida por dieta associada a hiperglicemia causou alterações na homeostase da mucosa intestinal com redução da frequência de IEL e células caliciformes no duodeno, aumento da permeabilidade intestinal, e uma redução da frequência de células Tregs nos linfonodos mesentéricos proximais. A soma desses fatores resultou na falha da indução tolerância oral a antígenos da dieta apresentando maior concentração de anticorpos IgG1 e IgE, e uma menor concentração TGF- $\beta$ .

## 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.10.001>>.

AITORO, R. *et al.* Gut microbiota as a target for preventive and therapeutic intervention against food allergy. *Nutrients*, v. 9, n. 7, p. 1–12, 2017.

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. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00229>>.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- $\kappa$ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 1, p. 11–22, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155041311000450X>>.

BECKER, C.; FANTINI, M. C.; NEURATH, M. F. TGF- $\beta$  as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 17, n. 1–2, p. 97–106, 2006.

BELKAID, Y. AND T. H. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation Yasmine. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121–141, 2015.

BILATE, A. M.; LAFAILLE, J. J. Induced CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells in Immune Tolerance . *Annual Review of Immunology*, v. 30, n. 1, p. 733–758, 2012.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.002>>.

BOUCARD-JOURDIN, M. *et al.*  $\beta$ 8 Integrin Expression and Activation of TGF- $\beta$  by Intestinal Dendritic Cells Are Determined by Both Tissue Microenvironment and Cell Lineage. *The Journal of Immunology*, v. 197, n. 5, p. 1968–1978, 2016. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1600244>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DE DOENÇAS E AGRAVOS NÃO. *VIGITEL BRASIL 2018 inear capital r região UF Tend . linear UF Tend . linear Bras.* [S.l: s.n.], 2019.

CAMPBELL, D. E. *et al.* Mechanisms of allergic disease - environmental and genetic determinants for the development of allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 45, n. 5, p. 844–858, 2015.

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.

CHEN, Y. *et al.* *Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance.* *Nature*. [S.l: s.n.], 1995

CHIANG, S. *et al.* The Protein Kinase IKK 3 Regulates Energy Balance in Obese Mice. *Cell*, v. 138, n. 5, p. 961–975, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.046>>.

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.

COOMBES, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007.

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

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. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X)>.

DIEFENBACH, A.; COLONNA, M.; KOYASU, S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity*, v. 41, n. 3, p. 354–365,

2014.

DOURADO, L. P. A. *et al.* Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cellular Immunology*, v. 270, n. 2, p. 198–206, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.05.008>>.

ESTERHÁZY, D ET AL. Compartmentalized lymph node drainage dictates intestinal adaptive immune responses. *Research Quarterly*, n. September, p. 464–475, 2019.

ESTERHÁZY, DARIA *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, DARIA; CANESSO, M. C. C.; MESIN, L.; MULLER, P. A.; CASTRO, T. B. R. DE; *et al.* Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune response. *Nature*, 2019.

ESTERHÁZY, DARIA; CANESSO, M. C. C.; MESIN, L.; MULLER, P. A.; DE CASTRO, T. B. R.; *et al.* Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature*, v. 569, n. 7754, p. 126–130, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1125-3>>.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *International Immunology*, v. 12, n. 12, p. 1733–1740, 2000.

FARIA, A M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Advances in immunology*, NULL, v. 73, p. 153–264, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673363>>.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology*, v. 13, n. 2–4, p. 143–57, 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918481>>.

FERGUSON, A.; MURRAY, D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut*, v. 12, n. 12, p. 988–994, 1971.

FONSECA, D. M. DA *et al.* Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. *Cell*, v. 163, n. 2, p. 354–366, 2015.

FUJISAKA, S. *et al.* Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent Find the latest version : Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. v. 126, n. 12, p. 4430–4443, 2016.

GANGWAR, R. S. *et al.* Mast cell and eosinophil surface receptors as targets for anti-allergic therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 170, p. 37–63, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.010>>.

GARIDOU, L. *et al.* The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR $\gamma$ t and Controls Metabolic Disease. *Cell Metabolism*, v. 22, n. 1, p. 100–112, 2015.

GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 3, p. 205–217, 2008.

GROSCWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 124, n. 1, p. 3–20, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>>.

GUSMAO-SILVA G, AGUIAR SLF, MIRANDA MCG, GUIMARÃES MA, ALVES JL, VIEIRA AT, CARA DC, MIYOSHI A, AZEVEDO VA, OLIVEIRA RP, FARIA AMC. Hsp65-Producing Lactococcus lactis Prevents Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Frontiers Immunology*, 11: 562905. doi: 10.3389/fimmu.2020.562905.

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

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*. [S.l: s.n.], 2007

HILL, J. A. *et al.* Retinoic Acid Enhances Foxp3 Induction Indirectly by Relieving Inhibition from CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> Cells. *Immunity*, v. 29, n. 5, p. 758–770, 2008a.



Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.018>>.

HILL, J. A. *et al.* Retinoic Acid Enhances Foxp3 Induction Indirectly by Relieving Inhibition from CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> Cells. *Immunity*, v. 29, n. 5, p. 758–770, 2008b.

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

HOUSTON, S. A. *et al.* The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunology*, v. 9, n. 2, p. 468–478, 2016.

HUANG, S. L.; SHIAO, G. M.; CHOU, P. Association between body mass index and allergy in teenage girls in Taiwan. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 29, n. 3, p. 323–329, 1999.

JANG, M. H. *et al.* CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 2, p. 803–810, 2006.

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.

JULIA, V.; MACIA, L.; DOMBROWICZ, D. The impact of diet on asthma and allergic diseases. 2015.

KATIA ANUNCIACÃO COSTA, 4 ANNE DANIELI NASCIMENTO SOARES, SAMUEL PENNA WANNER, 5, 6 *et al.* The gut microbiota regulates white adipose tissue inflammation and obesity via a family of microRNAs. *Science Translational Medicine*, v. 11, n. 496, p. 1–14, 2019.

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. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01300-08>>.

KIM, M. *et al.* Critical Role for the Microbiota in CX3CR1<sup>+</sup> Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses. *Immunity*, v. 49, n. 1,

p. 151- 163.e5, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.009>>.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 15, p. 639, 3 jun. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.75>>.

LOSS, G. *et al.* Prenatal and early-life exposures alter expression of innate immunity genes: The PASTURE cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 130, n. 2, p. 7–11, 2012.

LUCK, H. *et al.* Gut-associated IgA<sup>+</sup> immune cells regulate obesity-related insulin resistance. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11370-y>>.

LUCK, Helen *et al.* Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metabolism*, 2015. , v. 21, n. 4, p. 527–542Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.001>>.

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. *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*, 2015.

MATTEOLI, G. *et al.* Gut CD103<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Macrophages to CD103<sup>+</sup> Dendritic Cells. *Immunity*, v. 40, n. 2, p. 248–261, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.012>>.

MCDONALD, B. D.; JABRI, B.; BENDELAC, A. Diverse developmental pathways of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, n. August, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0013-7>>.

MIRANDA, M. C. G. *et al.* Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic

mice precede the onset of type 1 diabetes. *Journal of Leukocyte Biology*, n. June, p. 513–529, 2019.

MIROTTI, L. *et al.* Neural Pathways in Allergic Inflammation. *Journal of Allergy*, v. 2010, p. 1–11, 2010.

MITO, N. *et al.* Oral-tolerance induction in diet-induced obese mice. *Life Sciences*, 2006.

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

MOWAT, ALLAN MCI. To respond or not to respond — a personal perspective of intestinal tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0002-x>>.

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, 2005.

MUCIDA, D. S. *et al.* Decreased nasal tolerance to allergic asthma in mice fed an amino acid-based protein-free diet. 2004, [S.l.: s.n.], 2004.

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.

NISHIMURA, S. *et al.* CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine*, v. 15, n. 8, p. 914–920, 2009.

PRESCOTT, D. *et al.* NOD2 modulates immune tolerance via the GM-CSF–dependent generation of CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, n. 20, p. 10946–10957, 2020.

RAJPAL, D. K. *et al.* Selective spectrum antibiotic modulation of the gut microbiome in obesity and diabetes rodent models. *PLoS ONE*, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*,

v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1 nov. 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>>.

RENZ, H. *et al.* Food allergy. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, 2018.

REZENDE RM, OLIVEIRA RP, MEDEIROS SR, GOMES-SANTOS AC, ALVES AC, LOLI FG, GUIMARÃES MA, AMARAL SS, DA CUNHA AP, WEINER HL, AZEVEDO V, MIYOSHI A, FARIA AM. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Autoimmun.* 2013 Feb;40:45-57. doi: 10.1016/j.jaut.2012.07.012.

REZENDE, R. M.; WEINER, H. L. History and mechanisms of oral tolerance. *Seminars in Immunology*, v. 30, n. July 2016, p. 3–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.004>>.

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. 1995.

SAKAGUCHI, SHIMON. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, v. 22, p. 531–562, 2004.

SALDANHA, J. C. S. *et al.* A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 6, p. 809–816, 2004.

SCOTT, C. L. *et al.* CCR2 + CD103 - Intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells. *Mucosal Immunology*, v. 8, n. 2, p. 327–339, 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- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, v. 359, p. 693, 22 out. 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/359693a0>>.

SILVA, M. F. *et al.* Innate profiles of cytokines implicated on oral tolerance

correlate with low- or high-suppression of humoral response. *Immunology*, 2010.

SORINI, C. *et al.* Loss of gut barrier integrity triggers activation of islet-reactive T cells and autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 30, p. 15140–15149, 2019.

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.

Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.lib.umich.edu/pubmed/11345170%5Cnhttp://ovids.p.tx.ovid.com.proxy.lib.umich.edu/spb/ovidweb.cgi>>.

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. Disponível em:  
<<http://www.jci.org/articles/view/45887%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104761/pdf/JCI45887.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104761/>>.

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

TAO, R. *et al.* Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nature Medicine*, v. 13, n. 11, p. 1299–1307, 2007.

THAISS, C. A. *et al.* Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*, v. 1383, n. March, p. 1376–1383, 2018. Disponível em:  
<<http://science.sciencemag.org/cgi/content/short/359/6382/1376>>.

THAISS, C. A. *et al.* Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain. *Nature*, v. 540, n. 7634, p. 544–551, 2016. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1038/nature20796>>.

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.

VIANA, M. L. *et al.* Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition*, v. 26, n. 2, p. 218–223,

2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.005>>.

VISNESS, C. M. *et al.* Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 123, n. 5, p. 1163-1169.e4, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.1126>>.

WANG, H. *et al.* The association between immunoglobulin concentrations and prediabetes prevalence in a large Chinese cohort. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 73, p. 77-84, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.05.008>>.

WANG, S. *et al.* Article Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell*, v. 171, n. 1, p. 201-216.e18, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.027>>.

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, HOWARD L. *et al.* Oral tolerance. *Immunological Reviews*. [S.l.: s.n.], 2011

WEINER, HOWARD L. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and TR1 and TH3 regulatory cells. *Nature Immunology*, v. 2, p. 671, 1 ago. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/90604>>.

WEISS, J. M. *et al.* Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3<sup>+</sup> T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 209, n. 10, p. 1723-1742, 2012. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20120914>>.

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, 1911.

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

resistance. *Cell Metabolism*, v. 23, n. 3, p. 413–426, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.003>>.

WINER, S. *et al.* Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature Medicine*, v. 15, n. 8, p. 921–929, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2001>>.

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

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

ZHANG, X. *et al.* Activation of CD25 + CD4 + Regulatory T Cells by Oral Antigen Administration. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 8, p. 4245–4253, 2001.

**ANEXOS****Obesity associated with hyperglycemia impairs oral tolerance  
induction and aggravates food allergy**

Authors: Lícia Torres<sup>1</sup>; Mariana Camila Miranda; Luísa Martins  
Trindade; Vinícius Martins Dantas; Helder Carvalho; Mariana  
Almeida de Oliveira; Felipe Caixeta; Eliane Gomes; Momtchilo  
Russo; Genevieve Marcelin, Ana Maria Caetano de Faria; Tatiani  
Uceli Maioli....

Corresponding author: Tatiani Maioli, PhD

Depto. de Nutrição, EE–UFMG

Av. Alfredo Balena, 190, St. Efigênia. Belo Horizonte, MG 30130-  
100, Brazil

Tel: (5531) 34099858

E-mail: [tatianimaioli@gmail.com](mailto:tatianimaioli@gmail.com)



**ABSTRACT**

Obesity and type 2 diabetes are associated with chronic inflammation and the mucosal immune system has been implicated as an important affected site. Changes in gut homeostasis associated with disturbances in intestinal barrier function and in immune cells may compromise antigen-specific tolerance to luminal antigens and increase susceptibility to food allergies. In this study, we show that obese mice fed a high-caloric diet had important changes in the intestinal barrier with increased permeability and frequency goblet cells, as well as reduction in the frequency of regulatory T cells (Tregs) in the duodenal and jejunal lymph nodes. When orally treated with OVA, obese mice were resistant to oral tolerance induction, as seen by their inability to suppress the humoral and cellular response after OVA feeding when compared to the lean control group. Treating hyperglycemia in obese animals with Metformin improved glycemia, maintained intestinal permeability and restored oral tolerance induction in obese mice. One of the main consequences associated with the breakdown of oral tolerance is the development of food allergy. Indeed, obese mice had a more severe food allergy to OVA mounting an anaphylactic response when challenged with the allergen as compared to control mice. Some of these findings in mice were reproduced in obese humans. Individuals with either type 2 diabetes or glucose intolerance had higher serum IgE levels when compared to obese patients without glucose-related metabolic disorders. Together, our results show that obesity and hyperglycemia can cause failure in oral tolerance induction and aggravation of food allergy.

**Keywords:** Oral tolerance, obesity, hyperglycemia, immune system, mucosal immunology, food allergy.

## INTRODUCTION

Obesity is an increasing worldwide problem with pandemic proportions. Individuals with obesity are at risk of several metabolic diseases including cardiovascular disease, dyslipidemia and type 2 diabetes (1,2).

The immunological changes in obesity start in adipose tissue and includes altered tissue structure and secretion of components by adipocytes. There is increase in the secretion of cytokines such as TNF- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, leptin and resistin, and a parallel reduction in IL-10 and adiponectin characterizing obesity as a low-intensity inflammatory state (CINTI et al., 2005; HERSOUG; LINNEBERG, 2007; KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). The saturation of the hypertrophic capacity of adipocytes to store lipid excess increases the concentration of free fatty acids (FFA) (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011), which promote the activation of signaling pathways such as IKK $\beta$  and NF- $\kappa$ B, and signaling pathways by Toll-type receptors (TRL) (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011; CHIANG et al., 2009), which also favors the inflammatory state.

Obesity has been also associated, in humans and mice, with several alterations in the gut immune system including increasing of innate lymphoid cell populations in the intestine, high levels of IFN- $\gamma$  producing cells, and alterations in gut permeability (3). In humans, obesity enhances jejunal inflammation, increases the density of macrophage, T cells (CD3+), intraepithelial lymphocytes and mature dendritic cells (mDC), and induces higher expression of pro-inflammatory cytokines (IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ), chemokines, and co-stimulatory factors in *lamina propria* and in epithelial cells fractions. The increase of effector T cell populations in intestinal mucosa of obese subjects is also associated with the impairment of insulin response when compared with lean subjects (4).

The intestinal mucosa is the largest contact surface with the external environment (15) and the immune cells that are lodged there face the challenge to tolerate the vast number of antigens

that came from diet and from commensal microbiota, while generating protective immune responses against intestinal pathogens and toxins (16). This dichotomic responses depends on a fine immune homeostasis balance. Regulatory responses developed in the gut mucosal surface leads to oral tolerance induced to dietary proteins and to microbiota as a physiologic phenomenon, and it can be defined as an anti-inflammatory immune response to orally administered specific antigens with local and systemic effects (17). It generates specific suppression/regulation of immune responses to subsequent parenteral or subcutaneous injections of the same and associated antigens (16,18–21). The main mechanisms involved in the development of oral tolerance are the generation of tolerogenic dendritic cells (DCs) (24) and the differentiation of Foxp3-expressing regulatory T cells (7,10,11, 12) that inhibit specific cellular responses (16-20) and antibody production (23). Induced Foxp3+ CD4+ regulatory T cells act via the production of inhibitory cytokines, such as IL-10 and TGF- $\beta$  (CAO et al., 2007). The population of induced regulatory T (iTreg) cells involved in the induction of oral tolerance are heterogeneous and their generation depends on the cytokines and metabolites present in the environment. IL-22 is also associated with gut barrier integrity, it regulates lipid and glucose metabolism and contributes to mucosal immunity in diabetic mice (WANG, X. et al., 2014).

Failure in oral tolerance induction or the breakdown of existing tolerance mechanisms can result in immunopathology such as inflammatory bowel diseases (IBD) and food allergy (24). Disturbs of gut homeostasis can interfere in oral tolerance development and maintenance, since the phenomenon depends on mucosal homeostasis and integrity (FARIA, A M.; WEINER, 1999; WEINER *et al.*, 2011). Effects of obesity and its comorbidities, such as glucose intolerance and microbiota alterations, interfere in the gut immune response and cause the homeostasis breakdown with increased gut permeability favoring bacteria, and bacteria products distribution to blood stream (LUCK *et al.*, 2015; THAISS *et al.*, 2018)).

Food allergy affects about 5% of adults and 8% of children in westernized countries (SICHERER; SAMPSON, 2015), and this number could be increased by the high obesity prevalence. It occurs

as a consequence of the disruption in immunological tolerance to ingested food, resulting from either IgE-mediated reactions or non-IgE-mediated disorders, such as food protein-induced enteropathy syndrome, food protein-induced proctocolitis syndrome and coeliac disease (RENZ *et al.*, 2018). Immediate hypersensitivity reactions occur through the cross-linking between the IgE-FcεRI complex by the allergen resulting in mast cells degranulation, release of lipid mediators such as prostaglandins and leukotrienes, cytokines and chemokines, characterizing the initial phase of the allergic reaction. Cytokines and chemokines released in the initial phase start the late phase represented by the recruitment and activation of inflammatory cells, mainly eosinophils and Th2 lymphocytes, in the sites of antigen sensitization (GOULD; SUTTON, 2008).

In this study we aimed to evaluate the effect of obesity and hyperglycemic in oral tolerance induction. We showed that diet-induced obesity with hyperglycemia in mice was associated with alterations in the gut immune system, impairment of oral tolerance induction and aggravation of food allergy. Furthermore, we showed that obesity associated with type 2 diabetes (T2D) in humans was correlated with higher serum IgE levels and increased markers of gut homeostasis disruption. The understanding of the mechanisms involved in obesity and oral tolerance imbalance will enable the development of novel approaches for oral tolerance-based therapies and treatment for food allergy.

## **METHODS**

**MICE AND DIETETIC TREATMENT.** Four-week-old male C57BL/6 mice (average initial weight 20g) were maintained in the animal care facility of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) under specific pathogen free (SPF) conditions. All mice were housed, had free access to filtered water and food throughout the experiments according to the experimental protocols approved

by the Ethics Committee on Animal Care and Use (CEUA-UFMG, Brazil, protocol 335/2017) of UFMG.

**HIGHT SUGAR AND BUTTER DIET (HSB).** Mice received during all experimental protocol either AIN93G (28) diet as a control diet or hypercaloric diet, HSB, containing high amounts of sugar and butter according to Table 1.

**Table 1:** Diet composition

Diets/ingredients	AIN93G	HSB
Casein	200	100
Corn starch	397,5	208,6
Sugar	100	232
Destrinized starch	132	0
Commercial butter without salt	0	189
Soy oil	70	70
Cellulose	50	50
Mineral mix	35	35
Vita,in mix	10	10
L-Metionine	3	3
Choline bitartarate	2,5	2,5
BHT	0,014	0,014

Total (g)	1000	1000
Kcal/g	36,9	4,9
g of protein/g of body weight	0,04	0,04
Centesimal composition (%)		
Carbohydrate	64	36
Proteins	20	16
Lipids	16	48

**MEASUREMENT OF BODY WEIGHT AND METABOLIC PARAMETERS.** All mice were regularly weighed once a week during all experimental period. After 5 and 13 weeks, fasting blood glucose was measured using a capillary glycosometer (Accu—Chek Performa). For glucose tolerance tests, fasted mice received 2g of glucose per kg body weight (29). Blood was collected from the tail vein and glucose was measured in mg/dL with glucometer and strips (Accu—Chek Performa) 15, 30, 60, and 90 min thereafter.

**GUT PERMEABILITY.** Gut permeability assay was performed after orally intragastric gavage of 0.1 mL of diethylenetriamine penta-acetic acid (DTPA) labeled with <sup>99m</sup>technetium (<sup>99m</sup>Tc). After 4 hours, the radio activity diffusion was measured in the blood using an automated gamma counter (Perkin Elmer. Wallac Wizard 1470–020 Gamma Counter; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). The obtained results were compared with the standard dose and calculated as a percentage of the dose per gram of blood using the following equation: %dose/g blood= (cpm of blood/cpm dose of standard) ×100; where cpm represents the counts of radioactivity per minute (30).

**ELISA ASSAY.** Anti-OVA IgG1 serum antibodies were determined by ELISA according to antibody manufacture protocol and the anti-OVA-IgG1 (Southern Biotech 1070-05) titer were calculated as described previous (31). Secreted IgA (sIgA) was measured in the colon feces. The feces were collected and diluted at 100mg/mL in phosphate-buffered saline (PBS), then centrifuged for 20 minutes, 4000RPM, at 4°C. The sIgA concentration was measured in Nunc Maxi Sorp 96-well ELISA coated overnight with purified anti-mouse IgA mAb UNLB (1:10000) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) diluted in sodium carbonate buffer, pH 9.6, at 4 °C. Plates were washed with PBS containing 0.05% Tween 20 and blocked for 1h at room temperature with PBS containing 0.25% casein. Plates were incubated for 1h at room temperature with samples. Then, HRP anti-IgA mAb (Southern Biotechnology; 0.5mg/ml) was added and plates incubated for 1h at 37°C. The reaction was developed at room temperature with 100µl/well of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS; Sigma, A1888- 5G) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate in sodium citrate buffer. Reaction was interrupted by addition of 20µl/ well of SDS 1%. Absorbance was measured by an ELISA reader (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader) at 405 nm. Matched antibodies pairs were used for measuring TGF-β, IL-10, IFN-γ and TNF by ELISA (DuoSets, R&D Systems) using each specific standard according to manufacturer's protocol.

**ANALYSIS OF IgA COATED BACTERIA.** Feces from colon were collected and transferred to a plastic tube where they were diluted in sterile phosphate-buffered saline (100 mg/mL). Homogenates were centrifuged for 20 minutes, 4000 RPM, at 4°C. Supernatants were collected, filtered through a 70µm cell strainer, diluted (1:1000) in phosphate-buffered saline and centrifuged at 8000g to precipitate bacteria. Pellets obtained were incubated with and without FITC-labeled goat F(ab)<sub>2</sub> anti-mouse IgA for 20min. Samples were analyzed by flow cytometry (BD FACScan™).

**CELL CULTURE PREPARATION.** Mesenteric lymph nodes (mLN) and spleen were removed, cell suspensions were prepared using a tissue homogenizer and were gently centrifuged. The spleen red cells were lysed, and the suspension was centrifuged to isolate leukocytes. Isolated cells were cultured at  $1 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 medium (Life Technologies) enriched with 2nM L-glutamine, 50mM 2-mercaptoethanol, 100U/mL penicillin, 1mM sodium pyruvate, 0.1mM non-essential amino acids, 25mM HEPES, and 10% inactivated fetal bovine serum (SFB) and stimulated with OVA (10 $\mu$ g/mL) for cytokine secretion analyses. Supernatants were collected after 72h to measure IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  cytokines by ELISA.

**FLOW CYTOMETRY ANALYSIS CELLS.** Cells extracted from mesenteric lymph nodes (mLN), *lamina propria* and spleen were evaluated. The CD4 T lymphocytes, dendritic cells (DCs), innate lymphoid cells (ILC) and intraepithelial lymphocytes (IEL) were identified. Cells were incubated in polystyrene tubes with anti-CD16/CD32 mAb to block Fc RII/III receptors and stained on ice for 30min and for more 30 minutes at 4°C with live/died reaction. After, the cells were washed and 20-30 $\mu$ l of conjugated fluorochromes antibodies mix was added and incubated for 40min at 4°C for surface molecules. For intracellular labeling of the Foxp3, GATA3, ROR $\gamma$ t and T-bet transcription factor, we used commercial fixation/permeabilization kit (e-Bioscience) and samples were incubated for another 30minutes with Abs. After washing with PBS- BSA (0.5% BSA), the samples were submitted to flow cytometer. Samples were acquired at FACSCanto II or FACSFortessa (BD Biosciences) coupled to computers with Diva software. Populations of interest were delimited by size and granularity (Forward Scatter  $\times$  Side Scatter), and 50.000 or 100.000 events were acquired for subsequent analysis using FlowJo software.

Fluorescent-dye-conjugated Abs were purchased from eBioscience (USA): Anti- ROR $\gamma$ t, 12- 6988-82, Pe (Q31-378); Anti- mouse CD3, 555276, PE-cy5 (17A2); Anti-mouse CD19, 15-0.193-82



PerCP-Cy 5.5 (eBio1D3 (1D3)). Rat anti- mouse CD11b, 550993; PerCP-Cy 5.5 (M1/70 (RUO)). Mouse anti-GATA 3, 580405, Pe-Cy7 (L50-823); Mouse anti-T-bet, 563318, BV421(O4-46 (RUO)); LIVE/Dead™ Fixable Aqua Stain Kit, L34957; Anti mouse CD11b; 47-0112-82, APC -eFluor780 (M1/70); Anti mouse MHCII I-Ad, 17-5323-80 APC (AMS-32.1); anti-mouse CD11c, 49-0114-80, e-fluor 450 (N418); anti-mouse CD4, 11-0041-82, FITC (GK1.5); anti mouse FOXP3, 56-573-82 AF700 (FJK-16s); Anti mouse CD8b, 48-0083-80, Efluor 450 (eBioH35-17.2); anti-CD45, 25-0451-82, PE/Cy 7 (30-F11); Anti-mouse T-bet, 644813, APC (4B10); anti-FOXP3, 12-5773-82, Pe (FJK-16s); anti-CD11b, 47- 0112–82, APC (M1/70); anti-mouse CD4, 17-0041-82, APC (GK1.5); LIVE/Dead™ Fixable Aqua Stain Kit, L34957 or Biolegend Anti-mouse Anti-mouse CD45 103108, FITC (30-F11); Anti-mouse CD4, 116022, Alexa Fluor 700 (RM4-4); CD103 anti-mouse, 121419, FITC (2E7); anti-CX3CR1, 149006, Pe (SA011F11); F4/80 anti- mouse, 123113, PE/Cy7 (BM8); Anti-mouse CD4, 116015, PE/Cy7 (RM4-4); anti-mouse TCR $\gamma/\delta$ , 118107, PE (GL3). Anti-mouse TCR  $\beta$ , 109227, PerCP-Cy 5.5 (H57-597); Anti-mouse CD8a, 100712, APC (53-6.7).

**MICROBIOTA ISOLATION OF FECAL CONTENT AND MICROBIOTA DNA FROM FECES.** Feces were extracted from the colon of control and HSB feeding mice. Fecal DNA samples were extracted from fresh mouse fecal samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

**ORAL TOLERANCE INDUCTION.** The antigen used was crystallized egg albumin ovalbumin (OVA) grade V (Sigma-Aldrich Co.). Single feedings were performed by only intragastric administration (gavage) of 10mg OVA in 0.2ml saline using a round-tip 18-gauge stainless animal feeding needle (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). Control groups received either gavages of saline or bottles containing water. Seven days after oral treatment mice were injected intraperitoneally (i.p.)

with 10 µg OVA plus 3 mg of Al(OH)<sub>3</sub> as adjuvant in 0.2 ml of saline. A booster with 10 µg Ova in saline was given i.p. 14 days later and 7 days thereafter, mice were bled under anaesthesia from the axillary plexus and serum was collected for antibody assays.

**FOOD ALLERGY INDUCTION.** Food allergy to OVA using the protocol previously described by SALDANHA and collaborators (35). Mice were immunized intraperitoneally with 10µg OVA plus 1mg Al(OH)<sub>3</sub> in 0.2ml saline. A booster with 10µg OVA in 0.2ml saline was given 14days. After 7 days, mice were feeding daily with a 20% OVA solution for seven consecutive days. Mice weight and OVA intake were measured daily.

**ACTIVE CUTANEOUS ANAPHYLAXIS ASSAY.** Mice were sensitized to OVA and challenged with egg white solution in their drinking bottle for 7 days, the animals received an intradermal injection (i.d) on the back-containing OVA (20µg) or PBS, followed by an intravenous at tail of Evans Blue dye (1mg/ml). After 30min, the mice were euthanized and skin was removed for visualization (36).

**QUANTITATIVE RT-PCR.** RNAs from jejunal were prepared using RNeasy Tissue kit (Qiagen) and cDNAs were synthesized using SuperScript II and random hexamers (Promega). Quantitative PCR with SybrGreen was performed and relative quantification of each transcript in comparison to 18s was determined using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. All primer sequences are available upon request.

**DETECTION OF SERUM IGE LEVELS.** Serum IgE levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's protocols (IgE ELISA kits; cat. no. BMS2097).

**STATISTICAL ANALYSIS.** Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 software. Differences between control lean and HSB at matching ages were analyzed by either Student's t-test or ANOVA and Tukey's post test for the experiment on oral tolerance induction. The P-value of less than 0.05 was considered significant. Human samples analyses were performed with Kruskal-Wallis test and the data correlation was determined by Spearman. The P-value of less than 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### HSB-DIET INDUCED OBESITY DISTURB GUT HOMEOSTASIS IN MICE

Obesity is correlated with metabolic alterations and disruption of intestinal mucosa homeostasis. To induce obesity we used the high sugar butter diet (HSB) previously validated by our group (MAIOLI, 2015), which are more palatable and resembles better the fat and high carbohydrate content of most of the industrialized food usually consumed by humans (KAU *et al.*, 2011).

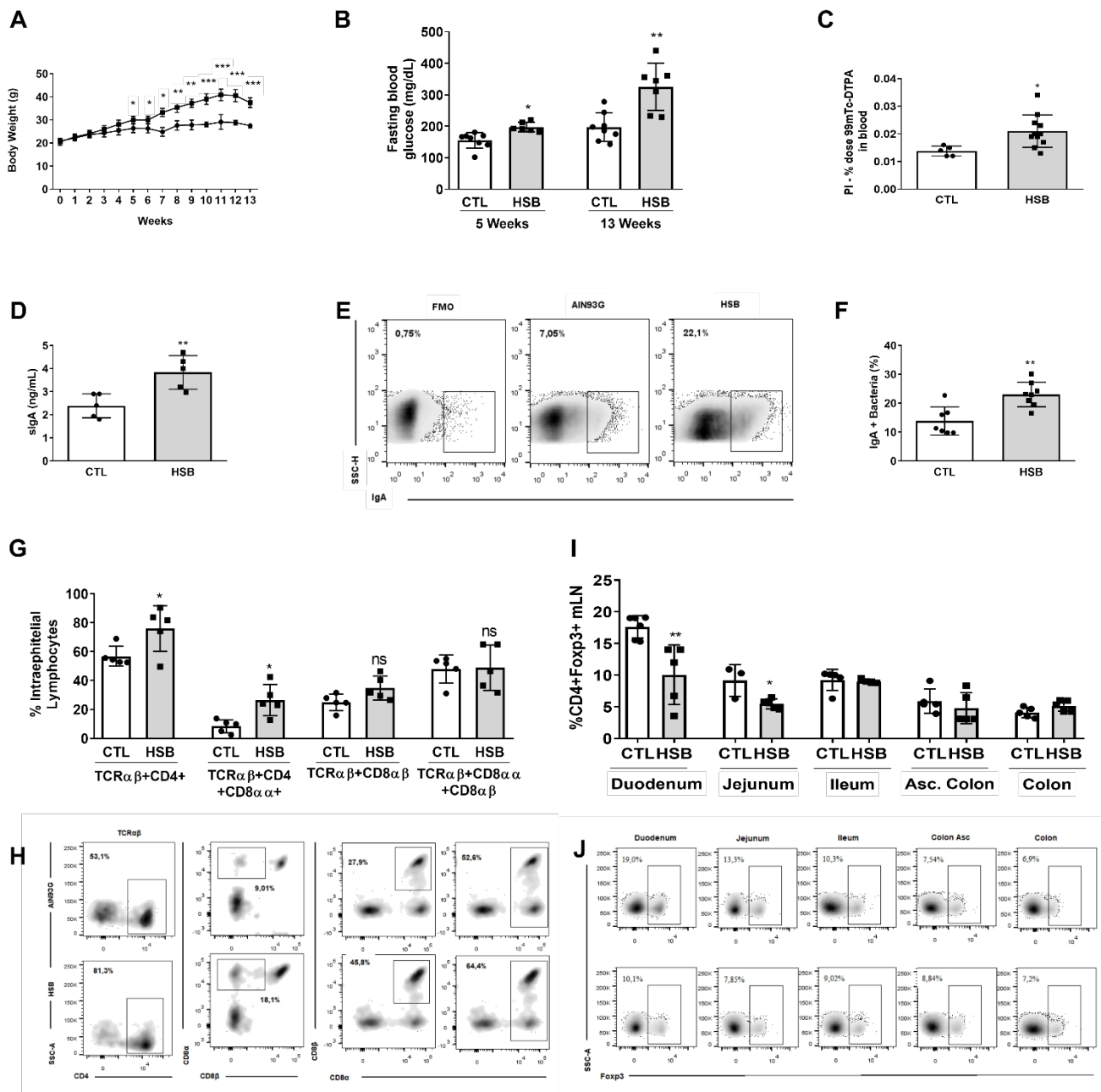
The mice received HSB or control diet for 13 weeks. HSB-diet induced significant body weight increase after 5 weeks compared to control mice (Fig. 1A), and this difference was more significant after 13 weeks of consumption. Body weight increase was associated to higher epididymal adipose index (Supplementary 1). Also was observed increase on glucose blood level after 5 weeks of HSB diet consumption that became aggravated after 13 weeks, with fasting

blood glucose levels compatible to type 2 diabetes (T2D) (Fig. 1B). HSB fed mice presented glucose intolerance and insulin resistance comparing to control mice (Supplementar 02). Other metabolic parameters such as triglycerides, total cholesterol, hepatic steatosis, and adipose tissue hypertrophic were measured and analyzed to characterize metabolic syndrome (Supplementary 3).

Effects of obesity and its comorbidities, such as glucose intolerance, increased blood FFA levels and microbiota alterations, interfere in the gut immunity (LUCK *et al.*, 2015). Previous study showed a positive correlation between hyperglycemia and dysfunction of the gut barrier, such as increased permeability (THAISS *et al.*, 2018). Then, we decide to investigate the effects of obesity in gut homeostasis disruption. Obese mice presented higher gut permeability to Tc-DTPA compared to control mice (Fig. 1C). The secretory IgA (sIgA) levels and IgA-coated bacteria frequency was also increased in obese mice (Fig. 1D-F). Next, we observed increased numbers of goblet cell in obese mice compared to control mice (Supplementary 4). In addition, HSB diet increased intraepithelial lymphocytes TCR $\beta$ +CD4+ and TCR $\beta$ +CD4+CD8 $\alpha$  frequencies measured by flow cytometry (Fig. 1G-H) and histo-pathology analysis (Supplementary 4). These cells contribute to gut homeostasis and to maintain the gut epithelial barrier function (SHERIDAN; LEFRANÇOIS, 2010).

The immune response in the gut mucosa is compartmentalized. The drainage is individualized for each part of the small intestine, and lymph nodes from duodenum and jejunum have critical importance for oral tolerance development, presenting higher frequency of Foxp3+ Treg cells and tolerogenic DCs comparing with distal mLN's (ESTERHÁZY *et al.*, 2019). The analyzes of obese mice mLNs showed lower frequency of regulatory T cells Foxp3+ (Tregs) in duodenal and jejunum lymph nodes when compared to control mice, and no difference were found in ileum, ascendant colon and colon draining lymph nodes (Fig. 1I-J). The alterations found in the obese mice gut characterize an inflammatory environment. Intestinal disorders with increased inflammatory profile can result in alterations in the immune response to dietary antigens and

microbiota (LUCK *et al.*, 2015). So, the sum of these changes are associated with loss of intestinal homeostasis and possibly contribute to the failure in oral tolerance induction to diet antigens.



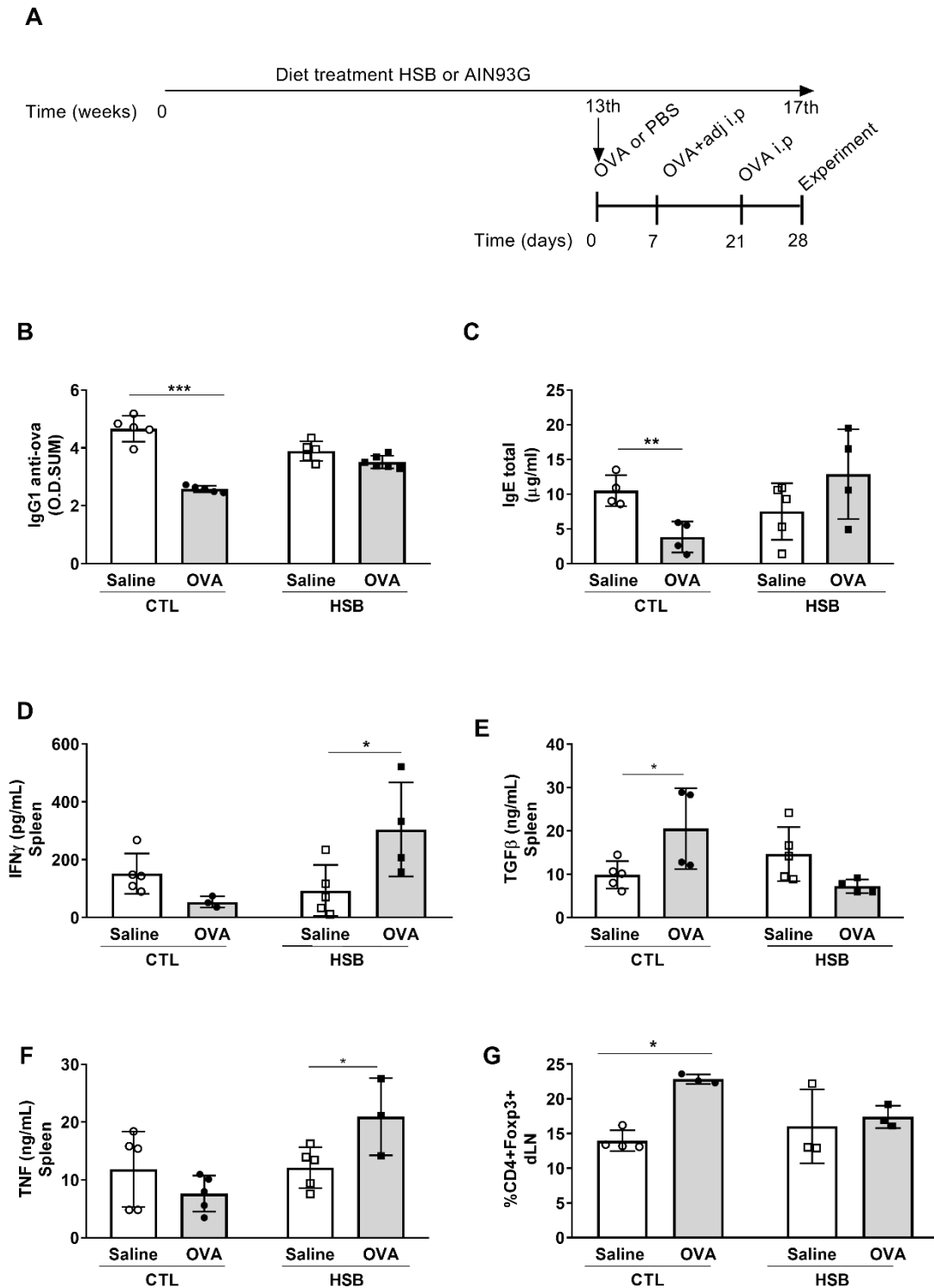
**Figure 1: Diet-induced obesity results in the metabolites and gut mucosa alterations in obese mice induced by diet. (A)** Body weight measured over 13 weeks of treatment with a control diet (AIN93G) and a diet containing high concentrations of butter and sugar (HSB); **(B)** Fasting blood glucose; **(C)** Plasma concentration of  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ . **(D)** sIgA concentrations in feces. **(E)** IgA

coated-bacteria from colon. **(F)** Representative plots from flow cytometer. **(G)** Phenotypic characterization of IELs in the small intestine. **(H)** Representative plots from IELs TCR  $\alpha\beta$ ; **(I)** IEL frequency. **(J)** Representative plots of frequencies of Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells from mLN (duodenal, jejunal, ileum and colon). **(L)** CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> tregs. (\*) represents the difference ( $p < 0.05$ ) between groups measured by Student t test. N=5, experiment representative of three.

### **OBESITY IMPAIRS ORAL TOLERANCE INDUCTION IN MICE**

Disturbance of gut homeostasis can interfere in oral tolerance development and maintenance, since the phenomenon depends on mucosal homeostasis and integrity (FARIA, A. M.; WEINER, 1999; WEINER *et al.*, 2011). Oral tolerance is a physiological phenomenon that contributes to prevent pathological conditions to food protein and commensal microbiota, inhibiting responses that could cause damage, such as hypersensitivity reactions, lymphocyte proliferation, and antibody formation (FARIA, A. M. C.; WEINER, 2006). Given the importance of gut mucosa homeostasis to oral tolerance development, we decided to evaluate whether obese mice were refractory to the oral tolerance induction. Orally administered antigens to promote subsequent tolerogenic immune responses, acts locally and systemically, and can attenuate inflammatory and harmful immune responses (EBBO *et al.*, 2017; CHUN *et al.*, 2019; CAO *et al.*, 2007). When orally treated with 10mg/OVA and immunized i.p 7 days later with Al(OH)<sub>3</sub>, lean mice presented lower levels anti-ova IgG1 and total IgE. However, obese mice were resistant to oral tolerance development as shown by their high levels of specific serum IgG1 and total IgE after previous OVA treatment (Fig. 1A-C). To measure also the specific cellular immune response, spleen and mesenteric lymph nodes cells were stimulated *in vitro* with OVA. We observed increased IFN- $\gamma$  levels in the supernatant of cells from spleen and mLN's of obese OVA fed mice (Fig. 1D and 1G), while TFG- $\beta$  levels were increased only in lean OVA fed mice (Fig. 1E). We also evaluated the frequency of Foxp3<sup>+</sup> cells in mLN's, an important site to OT development. OVA treated lean mice had

increased frequency of regulatory T cells CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> compared to immunized mice, but no differences were found in the frequency of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells between obese mice orally treated with OVA and only immunized mice (Fig. 2I-J). The role of regulatory T cells has been established as the main mechanism for oral tolerance induction. Thus, these data suggest that obesity has deleterious effect on OT induction due to a reduced suppression of specific anti-OVA IgG1 and total IgE and also by low TGF- $\beta$  levels, high levels of IFN-gamma production, and failure in Treg induction in the mLN.



**Figure 2: Diet induced obesity induced causes disturbance OT induction to orally administered antigen.**

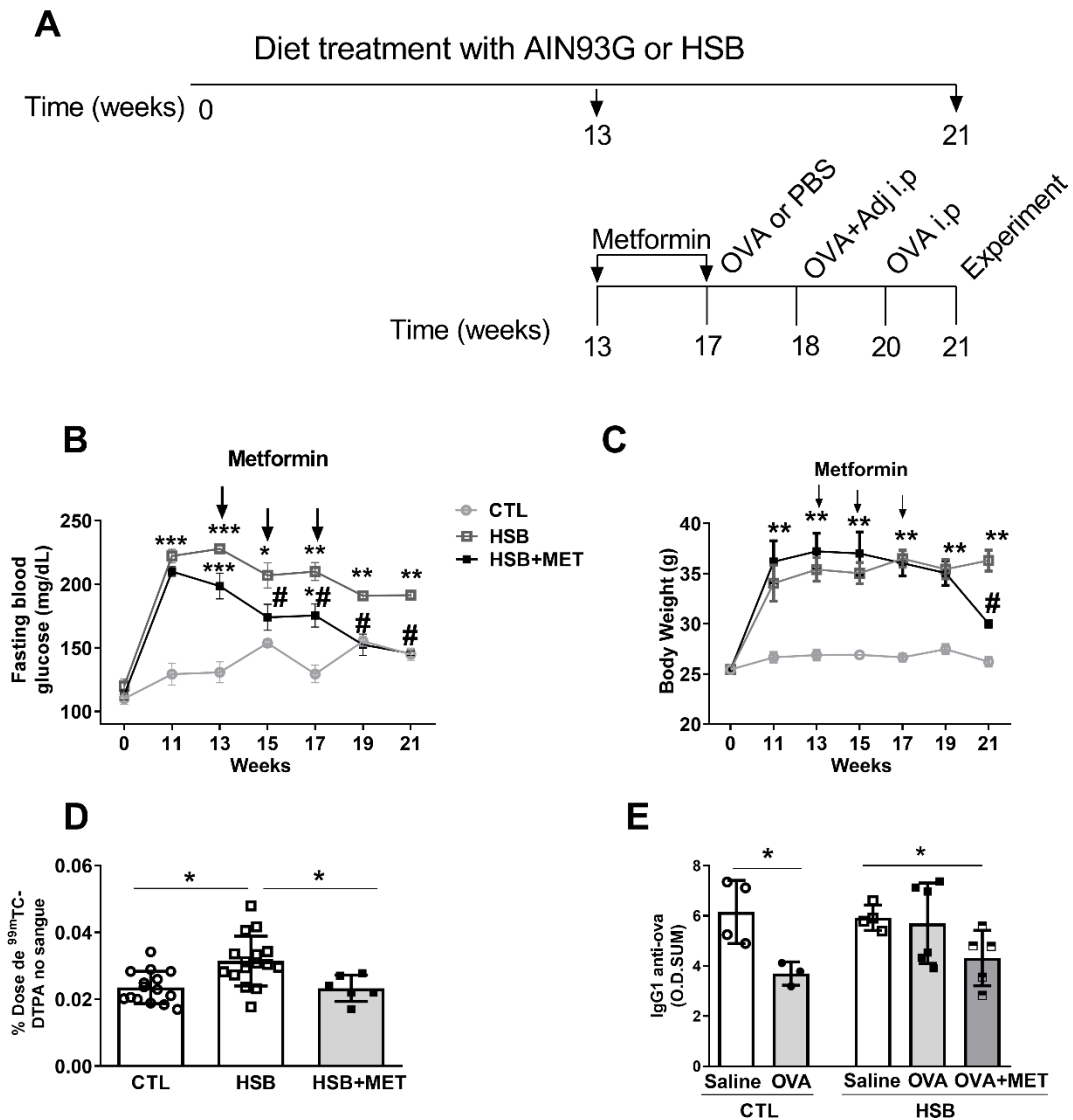
**(A)** Experimental design for OT induction. Mice received either AIN93G or HBS diet for 13 weeks. Then, they received an intragastric injection with 10mg of OVA. After 7 days, mice received an i.p injection containing 10µg of OVA in 1mg/ml of Al(OH)<sub>3</sub>, and 14 days after, mice received 10µg of OVA as a booster.



All experiments were performed 7 days after the last i.p. injection. **(B)** Serum levels of anti-OVA IgG1 from C57BL/6 animals treated with OVA or saline via oral (gavage) measured by ELISA. The results are expressed as arithmetic mean  $\pm$  deviation from the sum of the OD of the serial dilutions (O.D. SUM); **(C)** Serum levels of total IgE measured by ELISA. **(D-F)** Cytokines present in the cell supernatant. Results represent the concentration of IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  in the supernatant of cells stimulated with OVA. **(G)** Frequency of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg cells in mLN after OT induction analyzed by flow cytometry. **(H)** Representative plots. Graphics are representative of an individual experiment, performed at least 3 times. Each symbol indicates an individual mouse (n = 3 to 5). (\*) indicates p < 0.05 analyzed by Two-way ANOVA.

### **THE HYPERGLYCEMIA TREATMENT RESCUE ORAL TOLERANCE INDUCTION IN MICE**

Our group showed that non-obese diabetic mice (NOD) that spontaneously develop type 1 diabetes (T1D), were refractory to oral tolerance induction (MIRANDA; OLIVEIRA; TORRES; AGUIAR; PINHEIRO-ROSA; *et al.*, 2019). Also, Thaiss *et al.*, 2018 showed that hyperglycemia, not obesity is the cause of mucosal inflammation and gut permeability (THAISS *et al.*, 2018). Similarly, type 2 diabetes (T2D) developed by obese mice is associated with high glucose levels after 13 weeks of HSB-diet consumption and increased gut permeability. So, we decided to verify whether the failure in oral tolerance induction was due to obesity itself, or by hyperglycemia. To this end, after mice became obese, we treated them with the glycaemia modulator Metformin (1g/L) for 28 days (Fig. 3A), until when obese mice presented fasting glucose similar than control (Fig 3B). HSB-diet fed mice lost weight with treatment, but still different when compared to lean mice (Fig 3C). Metformin treated obese mice recovered the gut permeability and were similar to control lean mice (Fig.:3D). Metformin-treated obese mice that received OVA by gavage, resulted in oral tolerance induction, as measured by reduced levels of anti-OVA IgG1, and improved the gut permeability (Fig 3E). Suggesting that control of hyperglycemia is determinant for intestinal permeability and oral tolerance induction than obesity itself.



**Figure 3: Hyperglycemia treatment with metformin restored oral tolerance induction in obese mice. (A)** Experimental design for the obesity induction with HSB diet followed by Metformin (1g/kg of mice) treatment for 21 days in bottle of water, and the oral tolerance induction protocol. **(B)** Body weight measured during 21 weeks of treatment with Metformin. **(C)** Fasting blood glucose concentration. **(D)** Intestinal permeability determined by measuring the diffusion of radioactivity in the blood after the oral administration of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) labelled with technetium-99m (<sup>99m</sup>Tc). Data are representative of % dose of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) detected by counts per min of blood/counts per min. **(E)** Specific anti-Ova IgG1 in plasma of control - CTL, obese - HSB and obese metformin treated - HSB+MET mice after oral tolerance induction measured by ELISA. Graphics are

representative of an individual experiment, performed at least 3 times. Each symbol indicates an individual mouse (n = 3 to 5). (\*) indicates p <0.05 analyzed by Two-way ANOVA.

### **OBESITY AGGRAVATES FOOD ALLERGY IN MICE OBESE**

Obesity is an inflammatory state that may be associated with increased risk for food allergy (JULIA; MACIA; DOMBROWICZ, 2015; DOURADO *et al.*, 2011). Oral immunotherapy has been studied route of immunotherapy with low dose and time-dependent increase in the frequency of treatment success (VICKERY *et al.*, 2013). In addition, when oral tolerance induction failure or the oral tolerance breakdown to a specific antigen, also culminates in food allergy. In this sense, we evaluated whether obese mice were more susceptible to food allergy. To check this, we first immunized mice via intraperitoneal with 10 $\mu$ g OVA plus 1mg Al(OH)<sub>3</sub> and then, mice were orally challenge with a 20% OVA solution for seven consecutive days (Fig. 4A) (SALDANHA *et al.*, 2004). The allergic control lean mice drank less OVA solution, had increased levels of IgG1-anti OVA and IgE, however they did not lose weight or got expressive passive cutaneous anaphylaxis (Fig. 4). However, allergic obese mice drank less OVA solution (Fig. 4B), and lost 10% of body weight (Fig. 4C). Also, they had increased levels of IgG1-anti-OVA (Fig. 4D), even higher the lean mice and their IgE level were high after drink OVA solution without the immunization (Fig. 4E). The magnitude of passive cutaneous anaphylaxis in obese allergic mice were more intense than in lean allergic mice (Fig.4F). So, these data suggest that oral tolerance is impaired in obese animals, and this may contribute to the increased severity of food allergy.



Each symbol indicates an individual mouse (n = 3 to 5). (letters) indicates p <0.05 analyzed by Two-way ANOVA.

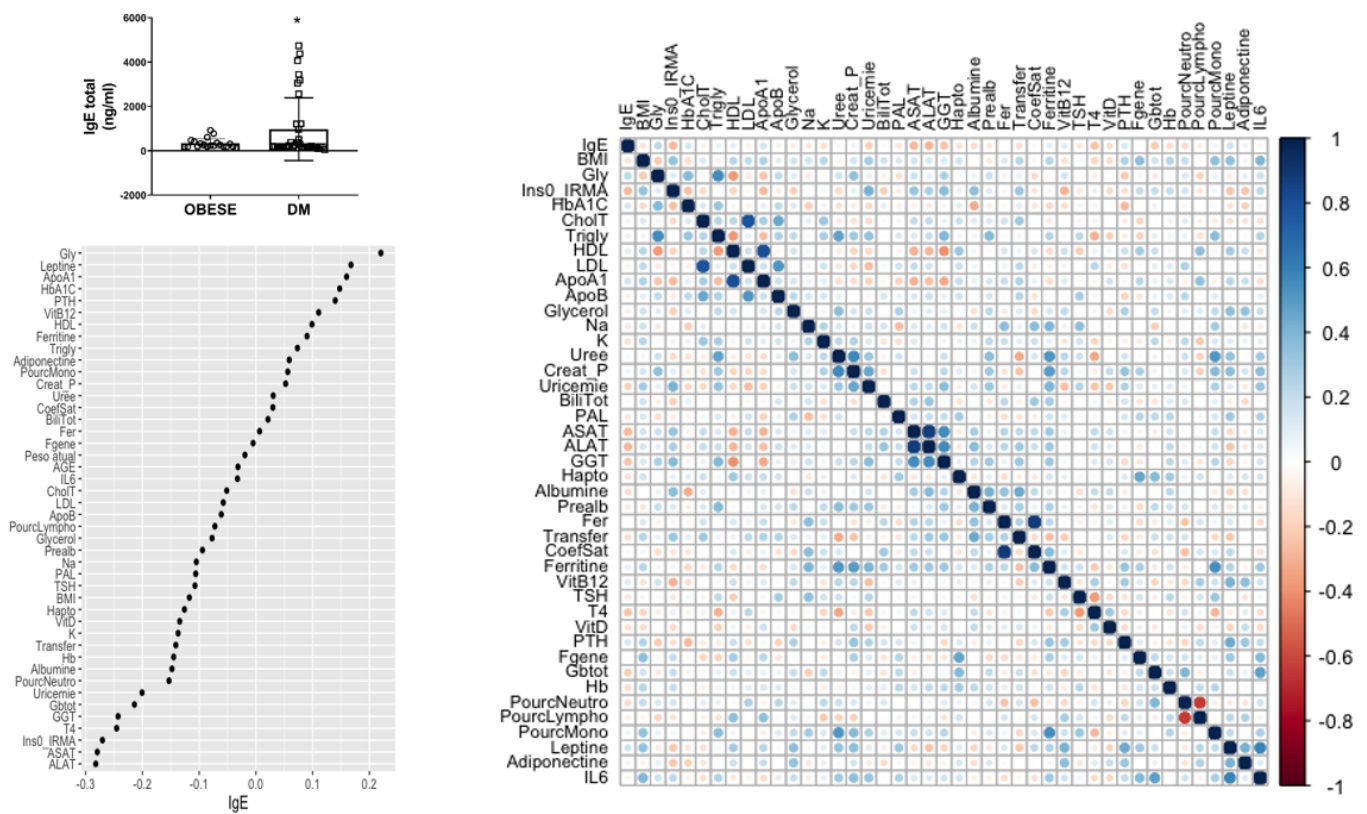
#### **HYPERGLYCEMIA ASSOCIATED WITH OBESITY IS CORRELATED WITH HIGH IGE LEVELS AND GUT ALTERATIONS IN HUMANS**

After observing the break in oral tolerance and the severity of food allergy in obese mice. We decided to investigate whether IgE levels correlates with hyperglycemia and obesity in humans. The development of food allergy, which is defined as an adverse immunological (hypersensitivity) response to food and can be IgE dependent (GOULD; SUTTON, 2008). The high IgE levels from plasma reflect overall allergic predisposition (SAMPSON et al., 2018). Previous studies have shown a positive correlation between obesity and allergic symptoms with higher levels of IgE in obese children and adults (ANVARI *et al.*, 2019; WEINER, H. L., 1994). Also, a cross-sectional study conducted among 8856 adults in China showed that pre-diabetic individuals presented positive correlation between high glucose levels and IgE (WANG, H. *et al.*, 2017).

First, we compared the IgE serum concentration between obese people and obese people with high glucose blood levels (T2D), the results showed higher IgE serum level in people with obesity and T2D (Fig. 5A). Then, we analyzed multiple serum parameters (Supplementary 5) between obese and obese with T2D and we found that IgE serum concentration had positive correlation with glycohemoglobin and fasting glucose in individuals with T2D (Fig 5B). These data suggests that high blood glucose concentration in obese individuals is associated with serum IgE.

In addition, we evaluated gene expression for proteins related to homeostasis in jejunum biopsy, and also we compared obese people without alterations in glucose metabolism, to obese with T2D. Among the genes, we identified down-regulation of IL-22, IL-10, Foxp3, ZO-1 and claudin 2, and up- regulation of IL-33 and IL-5 in obese people with T2D (Fig. 5C). So,

together these data suggest that similar to results observed in mice, obesity associated with high blood glucose levels, may be correlated high IgE levels and gut homeostasis disruption.



**Figure 5: Hyperglycemia associated with obesity is correlated with high IgE levels and gut alterations in humans. (A)** IgE plasma concentration measured by ELISA. **(B and C)** Correlation matrix and average correlations IgE levels with biochemistry parameters in the serum of 100 obese patients. **(D)** Heat map showing RNA expression of jejunum biopsies from individuals from obese patients without glucose metabolism alterations (OB) and obese with glucose intolerance (T2D).

## DISCUSSION

In the present study, we observed that mice with diet-induced obesity showed metabolic and immunological changes such as adipose tissue hypertrophy, hyperglycemia, dyslipidemia, increased intestinal permeability, increased number of goblet cells and

intraepithelial lymphocytes, and decreased regulatory cells in lymph nodes duodenal and jejunal. These changes, taken as a whole, suggest that diet-induced obesity has repercussions on the intestinal mucosa, undermining important factors in protecting the epithelial barrier and in local regulatory activities. We further show that the attempt to induce oral tolerance in obese mice failed when the antigen was administered by gavage. This demonstrates that the susceptibility to the induction of mechanisms responsible for oral tolerance is reduced in the face of obesity.

Oral tolerance can be understood as a physiological mechanism of immunoregulatory reactivity to antigens present in the diet and microbiota, triggered in the intestinal mucosa, but with systemic repercussions as it involves the control of the cellular and humoral response in other sites of the body specific to the antigen in question (WEINER et al., 2011). Thus, the induction of oral tolerance depends on conditions in the intestinal mucosa (Treg cells, tolerogenic dendritic cells and cytokines, for example) and is also an important mechanism for maintaining immune homeostasis in a location constantly challenged by contact with antigens.

To try to understand what resulted in the failure of oral tolerance induction, pertinent alterations in obesity such as hyperglycemia and intestinal dysbiosis were considered. Thus, we show that the treatment of hyperglycemia with Metformin and the treatment with antibiotics, which in turn, improved blood glucose and permeability, can favor the development of oral tolerance in obese animals.

On the other hand, the breakdown of oral tolerance can result in the development of inflammatory bowel problems, such as food allergies. Thus, we also show that food allergy is more severe in obese mice when compared to lean animals. Considering the results presented in mice, it was investigated whether these findings could be translated to humans. For this, clinical and biochemical parameters were considered, as well as the correlation of these factors with the serum levels of IgE, an antibody involved in allergic responses. First, we observed that obese individuals with type 2 diabetes mellitus have higher serum levels of IgE than those

individuals with obesity and without hyperglycemia. Thus, a positive correlation was identified between the levels of fasting glucose, glycated hemoglobin and serum IgE in obese individuals. In addition to important changes in gene expression in the jejunal mucosa such as reduced expression of FOXP3 and IL-10 genes in obese individuals with diabetes.

Obesity causes a low-rate chronic inflammation that can trigger metabolic dysfunctions and alterations in the immune response contributing to increased inflammatory process in the gut mucosa and also susceptibility to allergic diseases (LUCK *et al.*, 2015). In the present study we have shown that obesity induced by HSB diet induced obesity, metabolic syndrome, hyperglycemia, dyslipidemia and non-alcoholic hepatic steatosis. High glucose levels predisposes to the generation of glycated products, pancreatic toxicity, and macrovascular and microvascular complications affecting vital organs and increasing the risk of infection as well as the mortality (BÄCKHED *et al.*, 2004; KAU *et al.*, 2011; BUTLER; BTAICHE; ALANIZ, 2005).

Hyperglycemia, and not the excess of weight, can also interfere in the gut homeostasis and in the gut epithelial integrity (THAISS *et al.*, 2018), inducing increased permeability and alterations in the gut microbiota. The increased intestinal permeability induced by hyperglycemia leads to abnormal influx of microbial products culminating in their systemic dissemination. The effects of obesity induced by HSB diet had a similar impact in the gut homeostasis as showed by the increased number of goblet cells, of frequency of intraepithelial lymphocytes and of production of secretory IgA, as well as by the reduction in the frequency of Treg cells in duodenal and jejunal lymph nodes. Taken together, these alterations suggest that obesity disrupts the gut epithelial barrier and local immunological activities.

As shown in previous studies, IEL numbers are higher in obese individuals with or without diabetes when compared to eutrophic people (MONTEIRO-SEPULVEDA *et al.*, 2015). IELs display characteristics of innate and adaptive immunity (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011) and seem to provide immediate immune protection to avoid the dissemination of



pathogens. Dietary and microbiota metabolites are important stimuli for IELs activity, as their frequencies are reduced in the absence of intact dietary proteins (DA SILVA MENEZES *et al.*, 2003) and in germ-free mice, suggesting they require signals from the lumen for proliferation and function. Besides their physiologic role in gut homeostasis, IELs can mediate cytotoxic activity inducing inflammatory disorders, like celiac disease and inflammatory bowel disease. Infections by pathogenic bacteria or protozoa also induce responses from IELs, changing quickly its motility and movement pattern between intestinal epithelial cells (HOYTEMA VAN KONIJNENBURG *et al.*, 2017; SIEGMUND; LEHR; FANTUZZI, 2002). The increased frequencies of IEL in obesity may correlate with the increased intestinal permeability that favours contact and stimulation by luminal antigens.

We also observed increased levels of SIgA and higher frequency of IgA-coated bacteria in obese mice. The impact of obesity in IgA production is still unclear. Human studies showed that obese individuals have elevated levels of serum IgA, but the raise in IgA levels is also associated with infections by pathogenic bacteria or LDL oxidation in these individuals (VEHKALA *et al.*, 2013; CONG, Y. *et al.*, 2009). Although sIgA perform a role in host resistance to infections, specific-pathogen-free (SPF) mice present abundant concentrations of SIgA, while germ-free mice didn't, suggesting that the role of IgA is to maintain the balance between the host and its microbiota (CONG, Y. *et al.*, 2009). In this context, the increase in sIgA levels and IgA-coated bacteria in the obese mice may be associated with alterations in intestinal microbiota. As soon as obese IgA<sup>-/-</sup> mice presented higher bacterial count than the obese wild type mice (LUCK *et al.*, 2019). Thus, these results suggest that, in diet-induced obesity, IgA responds to the increased load of pathogenic and potentially penetrating microbial species in the intestine. On the other hand, bacteria present in the commensal microbiota that support homeostasis can be less available due to increase in high affinity IgA binding.

The gut homeostasis is due to also to the balance between regulatory and inflammatory cells. The population of iTreg cells from gut mucosa is involved in the regulatory mechanisms,

and their function depends on the cytokines and metabolites present in the environment. Esterhazy *et al.*, evaluated the gut-draining lymph nodes (gLNs) cell profile and observed a reduced frequency of Foxp3<sup>+</sup> cells from duodenal MLN to colon MLN (ESTERHÁZY *et al.*, 2019). Thus, duodenal lymph nodes have more tolerogenic characteristics with a higher concentration of ALDH2, RA and iTregs when compared to more distal lymph nodes. Our finding showed that in obese mice there is reduced Tregs frequency in the duodenal and jejunal MLN, when compared with control lean mice.

Taking together the gut alteration we have observed in obese mice, we asked whether oral tolerance induction would be induced. We observed that the oral administration of the antigen was not able to induce oral tolerance in mice fed HSB diet, as verified by maintenance of high levels of anti-OVA IgG1 and total IgE, compared with obese treated with saline. The specific IgG1 inhibition is a very sensible way to measure the susceptibility to oral tolerance induction, since this immunoglobulin isotype is the hardest to inhibit by orally administration antigens (OLIVEIRA *et al.*, 2015; CANESSO *et al.*, 2018). This demonstrates that the mechanisms involved in the susceptibility for oral tolerance induction is decreased in obese mice. Thus, the failure to induce oral tolerance may have occurred due to changes in homeostasis in the intestinal mucosa and in the cell profile that are important for the development of oral tolerance or due to the low functionality of the Treg cells in suppressing the immune response. Treg cells might regulate tolerance to dietary antigens by inhibiting effector T cell responses, suppression of mast cell and innate lymphoid cell 2 (ILC2) activation (STEPHEN-VICTOR; CRESTANI; CHATILA, 2020).

Among the crucial mechanisms for oral tolerance induction are the production of TGF- $\beta$  and IL-10 cytokines by specific induced T cells in mucosa through oral administration of antigens (MENGEL *et al.*, 1995; SPEZIALI *et al.*, 2018; VAZ *et al.*, 1997; LUCK *et al.*, 2019). Mucida and collaborators showed that the failure in the development of iTregs and the blocking of the action of TGF- $\beta$  compromises oral tolerance development (MUCIDA *et al.*, 2005). Mice with diet-

induced obesity did not present increased TGF- $\beta$  in the cells supernatants upon orally OVA administration, neither IL-10. Thus, the failure of lymphoid organ cells in obese mice to induce an increase in the concentration of TGF- $\beta$  may also be an important aspect of the difficulty to induce oral tolerance in obese mice. Finally, while in mice fed AIN93G diet had reduced IFN- $\gamma$  concentration in cell supernatant after orally received, the obese mice presented increase IFN- $\gamma$  concentration in the cell culture supernatant of both the spleen and MLNs. The high concentration of IFN- $\gamma$  has deleterious effects on intestinal barriers, inducing the reduction or dissociation of intestinal junction proteins such as ZO-1 and occludins (BEAUREPAIRE; SMYTH; MCKAY, 2009). In mice with diet-induced obesity there is change in the immune cells populations in intestinal *lamina propria* to an inflammatory pattern characterized by reduction of FOXP3+ Treg cells, increase of Th1 cells and IFN- $\gamma$  producing TCD8+ cells (WINER *et al.*, 2016). At this sense, our results are in agreement with this previous one, and it is also a reason for oral tolerance induction failure.

Our group reported that alterations in the intestinal mucosa of non-obese diabetic (NOD) mice that present spontaneously development of type 1 diabetes, precedes hyperglycemia. The study described that NOD mice presented dysbiosis, reduced levels of mucus production and altered frequencies of dendritic cells and Tregs in the mesenteric lymph nodes. These early alterations in gut components detected in NOD mice resulted in fail to oral tolerance induction (MIRANDA; OLIVEIRA; TORRES; AGUIAR; PINHEIRO-ROSA; *et al.*, 2019; SORINI *et al.*, 2019). As, we have found similar results on CD4+FoxP3+ Treg cells frequencies, that were reduced in duodenum and jejunum draining lymph nodes in obese mice, we asked whether hyperglycemia could interfere with the induction of oral tolerance. To do this treated obese mice with a drug (Metformin) that is able to decrease blood glucose levels.. After the treatment, obese mice presented glucose levels lower than 200mg/dL, improved gut permeability and developed oral tolerance. These results suggest that hyperglycemia, more than weigh excess could impact gut homeostasis. The impact of high glucose concentrations affect

intestinal epithelial cells potentially resulting in alterations of gut barrier function, increased gut permeability, risk for enteric infection and dysbiosis (14). In humans, the presence of metabolic syndrome may favor the worsening of infections in the intestinal mucosa in patients suffering with obesity and diabetes *mellitus* (MULLER *et al.*, 2005). Therefore, suggest that hyperglycemia is the metabolic implication for gut health and to oral tolerance induction. This may provide a mechanistic basis for a variety of seemingly unrelated inflammatory bowel diseases and food allergies associated with obesity (BELKAID, 2015; BEAUREPAIRE; SMYTH; MCKAY, 2009).

Extrinsic environmental and lifestyle factors can contribute to development of allergies and breaking tolerance state (BELKAID, 2015). In this scenario, failure in oral tolerance induction associated with metabolic alterations and changes the immune cell profile, may be correlated with increased food allergy development and severity in individuals with obesity associated with hyperglycemia. In the presence of food allergy and hyperglycemia there is increased intestinal permeability which favor higher contact with dietary antigens and commensal microbiota with intestinal immune cells, improving pathological inflammation (SCHACHTER; PEAT; SALOME, 2003; THAISS *et al.*, 2018).

In order to clarify the relation between oral tolerance breakdowns in obesity with food allergy severity, obese mice were previously immunized, and post orally challenged with OVA, a protocol for food allergy experimental model. We observed a more pronounced weight loss and vascular permeability in allergic obese mice, suggesting a more severe allergy reaction in obese mice compared with lean control mice. There was no difference in IgE levels, it is important to highlight those obese mice without any stimulus already present high total-IgE levels, suggesting that obesity induce IgE secretion, also before immunization.

IgE is a common diagnostic measure in clinical practice for the diagnosis of allergies and can be influenced by a series of modifiable and non-modifiable factors, including sex, age, smoking and alcoholism (BARBEE *et al.*, 1981). Furthermore, increased total serum IgE

concentrations have also been reported in a number of non-allergic diseases in humans (GALLI; TSAI, 2016). Previous studies have shown a positive correlation between obesity, allergic symptoms and high serum IgE levels in children and adults (HUANG; SHIAO; CHOU, 1999; JULIA; MACIA; DOMBROWICZ, 2015; VISNESS *et al.*, 2009; WANG, H. *et al.*, 2017). In addition, another study conducted with 8,856 adults in China showed that pre-diabetic individuals had a positive correlation between high levels of fasting glucose and IgE (WANG, H. *et al.*, 2017). In this scenario, increased serum IgE concentrations may be correlated with obesity and hyperglycemia.

To try to translate our findings in mice with the clinic, we assessed whether there was any correlation between IgE production with obesity and hyperglycemia. For this purpose, serum IgE was measured in a cohort of obese individuals, segregated between obese individuals and obese with DM2. The results showed higher levels of total IgE in obese patients with DM2 when compared to obese patients without diabetes. This results showed an association between a possible break in tolerance and hyperglycemia.

Metabolic syndrome has been associated with increased IgE in the Korean population (KIM *et al.*, 2018). In this population, serum IgE concentration was also associated with components of the metabolic syndrome, such as central obesity, hyperglycemia, hypertension and serum triglycerides. In contrast, HDL cholesterol levels were negatively associated with IgE (KIM *et al.*, 2018). Likewise, it has been shown to increase serum IgE in patients with diabetes and prediabetes compared to normoglycemic individuals (WANG, Z. *et al.*, 2013). Thus, after analyzing the correlation of serum IgE with other parameters, metabolic and clinical, we also identified a positive association between plasma IgE and factors such as glycated hemoglobin, leptin and triglycerides.

Considering leptin as a factor that could explain this association between IgE and metabolism, it is known that this hormone can act on T cells by decreasing the signaling for the

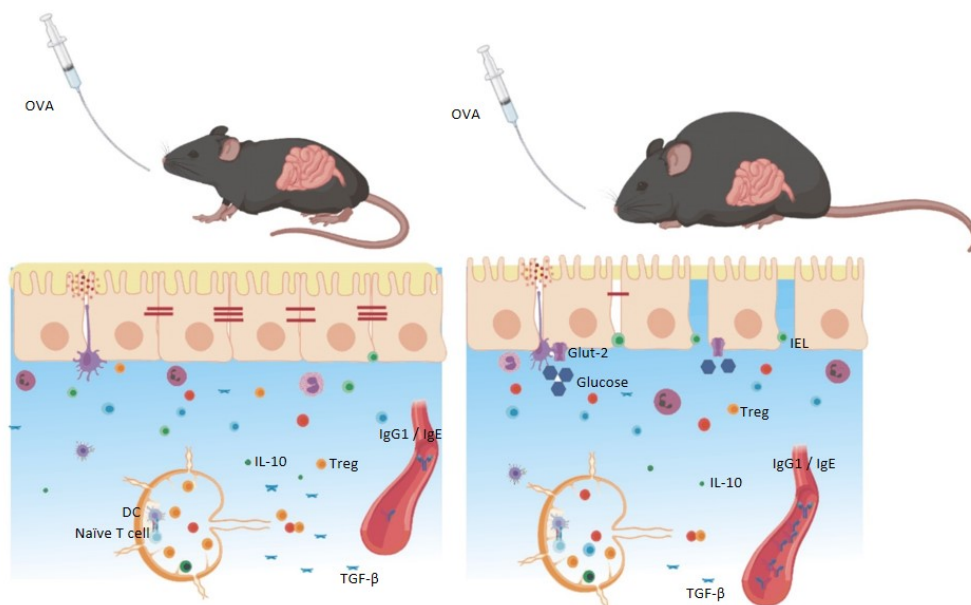
proliferation of Foxp3+CD4+CD25+ cells in humans (TALEB *et al.*, 2007). In human cells, Foxp3+ expression was significantly increased when lymphocyte cultures received anti-leptin antibody after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 (DE ROSA *et al.*, 2007). Another study showed that mice with experimental asthma induced by OVA, which also received leptin, increased plasma concentrations of total IgE and asthma severity (SHORE *et al.*, 2005). These data together suggest that leptin may be the link that correlates obesity with IgE and consequently with increased susceptibility to allergies.

In addition to the association of plasma IgE with metabolic variables, the expression of genes associated with intestinal homeostasis in jejunal biopsies of obese patients with no changes in glucose metabolism was also evaluated, compared to obese patients with glucose intolerance and/or DM2. The selected genes are predominantly involved in metabolic pathways, immune response and maintenance of the epithelial barrier (DALMAS *et al.*, 2014, FARIA, A. M. C.; WEINER, 2005).

The results found showed that mRNA expression for IL-10, IL22, Foxp3, claudin and ZO1 were reduced in obese individuals with DM2, compared to obese individuals without DM2. Importantly, these genes are important for the expression of proteins responsible for maintaining intestinal integrity and for inducing oral tolerance. The main mechanisms underlying the actions of Foxp3 cells include the production of inhibitory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$  (CAO *et al.*, 2007). On the other hand, IL-22 is associated with the integrity of the intestinal barrier, regulates lipid and glucose metabolism, and contributes to mucosal immunity in diabetic mice (WANG, X. *et al.*, 2014). In a healthy intestine, the regulated environment is observed to constantly produce proteins from tight junctions, such as ZO-1 and claudin 2, which are essential for intestinal integrity. Down regulation expression of these genes in obese humans suggests changes in intestinal homeostasis with a possible break in immune tolerance and in the balance of the intestinal immune response.

In addition, mRNA expression for the cytokines IL-33 and IL-5 up regulation in the jejunum of obese patients with DM2 when compared to obese individuals. IL-33 has been identified as a mediator of inflammatory diseases such as asthma, cardiovascular and allergic diseases. Furthermore, it is produced by intestinal epithelial cells upon damage, acting as an alarmin (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016). Interleukin 5 (IL-5), behave on activation, differentiation and growth of eosinophils at sites of inflammation. In allergic conditions, eosinophils mature under the influence of IL-5 and modulate immune reactions (E KALI S. THOMAS, 2017). Together, these data suggest that, similarly to the findings in mice, obesity associated with hyperglycemia may be favoring the occurrence of allergy.

Diet-induced obesity is able to break intestinal homeostasis, and this break in homeostasis makes it difficult to induce oral tolerance and increases susceptibility to food allergy. Resistance to developing oral tolerance is more related to hyperglycemia rather than being overweight. Obese humans with DM2 have increased IgE production and may be more susceptible to the development of IgE-mediated allergic symptoms. Therefore, obesity leads to resistance to the development of oral tolerance and increased susceptibility to allergies.



## References

ANVARI, S. *et al.* IgE-Mediated Food Allergy. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, v. 57, n. 2, p. 244–260, 1 out. 2019.

BÄCKHED, F. *et al.* Linked references are available on JSTOR for this article : The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2004.

BARBEE, R. A. *et al.* Distribution of IgE in a community population sample: correlations with age, sex, and allergen skin test reactivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 68, n. 2, p. 106–111, 1981.

BEAUREPAIRE, C.; SMYTH, D.; MCKAY, D. M. Interferon- $\gamma$  Regulation of Intestinal Epithelial Permeability. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 29, n. 3, p. 133–144, 2009. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jir.2008.0057>>.

BELKAID, Y. AND T. H. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation Yasmine. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121–141, 2015.

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.

CANESSO, M. C. C. *et al.* The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. *Mucosal Immunology*, v. 11, n. 3, p. 820–834, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/mi.2017.88>>.

CAO, X. *et al.* Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*, 2007.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3007>>.

CHUN, E. *et al.* Metabolite-Sensing Receptor Ffar2 Regulates Colonic Group 3 Innate Lymphoid



Cells and Gut Immunity. *Immunity*, v. 51, n. 5, p. 871- 884.e6, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.014>>.

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. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0812681106>>.

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 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.

DOURADO, L. P. A. *et al.* Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cellular Immunology*, v. 270, n. 2, p. 198–206, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.05.008>>.

EBBO, M. *et al.* Innate lymphoid cells: Major players in inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 11, p. 665–678, 2017.

ESTERHÁZY, D. *et al.* Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune response. *Nature*, 2019.

FARIA, A M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Advances in immunology*, NULL, v. 73, p. 153–264, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673363>>.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology*, v. 13, n. 2–4, p. 143–57, 2006.

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. *National Institutes of Health*, v. 18, n. 5, p. 693–704, 2016.

GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology*, v. 8,

n. 3, p. 205–217, 2008.

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.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.046>>.

HUANG, S. L.; SHIAO, G. M.; CHOU, P. Association between body mass index and allergy in teenage girls in Taiwan. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 29, n. 3, p. 323–329, 1999.

JULIA, V.; MACIA, L.; DOMBROWICZ, D. The impact of diet on asthma and allergic diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 5, p. 308–322, 2015.

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

KIM, M. K. *et al.* House dust mite and Cockroach specific Immunoglobulin e sensitization is associated with diabetes mellitus in the adult Korean population. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20573-0>>.

LUCK, H. *et al.* Gut-associated IgA+ immune cells regulate obesity-related insulin resistance. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11370-y>>.

LUCK, Helen *et al.* Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metabolism*, 2015. , v. 21, n. 4, p. 527–542 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.001>>.

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.

MENGEL, J. *et al.* Anti-CD44 T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunology Letters*, v. 48, n. 2, p. 97–102, 1995.

MIRANDA, M. C. G.; OLIVEIRA, R. P.; TORRES, L.; AGUIAR, S. L. F.; PINHEIRO-ROSA, N.; *et al.*

Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *Journal of Leukocyte Biology*, n. June, p. 513–529, 2019.

MIRANDA, M. C. G.; OLIVEIRA, R. P.; TORRES, L.; AGUIAR, S. L. F.; PINHEIRO-ROSA, N.; *et al.* Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 106, n. 3, p. 513–529, 2019.

MONTEIRO-SEPULVEDA, M. *et al.* Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metabolism*, v. 22, n. 1, p. 113–124, 2015.

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, 2005.

MULLER, L. M. A. J. *et al.* Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, n. 3, p. 281–288, 2005.

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

RENZ, H. *et al.* Food allergy. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, 2018.

SALDANHA, J. C. S. *et al.* A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 6, p. 809–816, 2004.

SAMPSON, H. A. *et al.* Mechanisms of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 141, n. 1, p. 11–19, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.005>>.

SCHACHTER, L. M.; PEAT, J. K.; SALOME, C. M. Asthma and atopy in overweight children. *Thorax*, v. 58, n. 12, p. 1031–1035, 2003.

SHORE, S. A. *et al.* Effect of leptin on allergic airway responses in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 115, n. 1, p. 103–109, 2005.

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. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508502000343>>.

SORINI, C. *et al.* Loss of gut barrier integrity triggers activation of islet-reactive T cells and autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 30, p. 15140–15149, 2019.

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.

STEPHEN-VICTOR, E.; CRESTANI, E.; CHATILA, T. A. Dietary and Microbial Determinants in Food Allergy. *Immunity*, v. 53, n. 2, p. 277–289, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.025>>.

TALEB, S. *et al.* Defective leptin/leptin receptor signaling improves regulatory T cell immune response and protects mice from atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 27, n. 12, p. 2691–2698, 2007.

THAISS, C. A. *et al.* Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science*, v. 1383, n. March, p. 1376–1383, 2018. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/cgi/content/short/359/6382/1376>>.

VAZ, N. *et al.* Immaturity, ageing and oral tolerance. *Scandinavian journal of immunology*, v. 46, n. 3, p. 225–9, set. 1997.

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, 2013.

VICKERY, B. P. *et al.* Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 131, n. 1, p. 128- 134.e3, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.10.048>>.

VISNESS, C. M. *et al.* Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 123, n. 5, p. 1163- 1169.e4, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.1126>>.

WANG, H. *et al.* The association between immunoglobulin concentrations and prediabetes prevalence in a large Chinese cohort. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 73, p. 77–84, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.05.008>>.

WANG, X. *et al.* Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature*, v. 514, n. 7521, p. 237–241, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature13564>>.

WANG, Z. *et al.* Immunoglobulin e and mast cell proteases are potential risk factors of impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in humans. *Annals of Medicine*, v. 45, n. 3, p. 220–229, 2013.

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, HOWARD L. *et al.* *Oral tolerance. Immunological Reviews*. [S.l.: s.n.], 2011

WINER, D. A. *et al.* The intestinal immune system in obesity and insulin resistance. *Cell Metabolism*, v. 23, n. 3, p. 413–426, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.003>>.

1. Sun K, Kusminski CCM, Scherer PEP. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin ...* [Internet]. 2011;121(6):2094–101. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/45887%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3>

104761/pdf/JCI45887.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104761/

2. Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2016 Jun 3;15:639. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.75>
3. Luck H, Tsai S, Chung J, Clemente-Casares X, Ghazarian M, Revelo XS, et al. Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metabolism* [Internet]. 2015;527–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.001>
4. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, et al. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab*. 2015;22(1):113–24.
5. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* [Internet]. 2014;157(1):121–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
6. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):411–20.
7. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):1046–51.
8. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*. 2013;14(7):685–90.
9. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Semenkovich CF, et al. Linked references are available on JSTOR for this article : The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. 2004;101(44):15718–23.
10. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14691–6.

11. Robertson SJ, Lemire P, Maughan H, Goethel A, Turpin W, Bedrani L, et al. Comparison of Co-housing and Littermate Methods for Microbiota Standardization in Mouse Models. *Cell Rep* [Internet]. 2019;27(6):1910-1919.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.023>
12. Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, Raybould HE. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2015;308(10):G840–51.
13. Katia Anunciação Costa, 4 Anne Danieli Nascimento Soares, Samuel Penna Wanner, 5 6, Rosana das Graças Carvalho dos Santos, 4 Simone Odília Antunes Fernandes 7, Flaviano dos Santos Martins, 8 Jacques Robert Nicoli, 8 Caândido Celso Coimbra 5, Cardoso and VN. The gut microbiota regulates white adipose tissue inflammation and obesity via a family of microRNAs. *Sci Transl Med*. 2019;11(496):1–14.
14. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Sci* [Internet]. 2018;1383(March):1376–83. Available from: <http://science.sciencemag.org/cgi/content/short/359/6382/1376>
15. Moog F. The Lining of the Small Intestine. *Sci Am* [Internet]. 1981 Apr 11;245(5):154–79. Available from: <http://www.jstor.org/stable/24964607>
16. Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance Immunological activities in the gut mucosa. 2005;206:232–59.
17. Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases Faria, A. M. C., & Weiner, H. L. (2006). Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & Developmental Immunology*, 13, 143–57. <https://doi.org/10.1080/17402520600>. *Clin Dev Immunol*. 2006;13:143–57.
18. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* [Internet].

2012;5(3):232–9. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3328017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

19. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille M. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1923–33.

20. Akdis M. Regulatory Immune Mechanisms in Tolerance to Food Allergy. 2018;9(December):1–9.

21. Weiner HL. Oral Tolerance: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens. *Annu Rev Immunol*. 1994;12(1):809–37.

22. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25 + CD4 + Regulatory T Cells by Oral Antigen Administration . *J Immunol*. 2001;167(8):4245–53.

23. Vaz NM, Maia LCS, Hanson DG, Lynch JM. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol*. 1977;60(2):110–5.

24. Belkaid Y and TH. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation Yasmine. *Cell*. 2015;157(1):121–41.

25. Visness CM, London SJ, Daniels JL, Kaufman JS, Yeatts KB, Siega-Riz AM, et al. Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2009;123(5):1163-1169.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.1126>

26. Huang SL, Shiao GM, Chou P. Association between body mass index and allergy in teenage girls in Taiwan. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(3):323–9.

27. Julia V, Macia L, Dombrowicz D. The impact of diet on asthma and allergic diseases. *Nat*



Rev Immunol. 2015;15(5):308–22.

28. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr. GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* [Internet]. 1993 Nov 1;123(11):1939–51. Available from: <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>

29. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* [Internet]. 2009;15(8):921–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2001>

30. Viana ML, Santos RGC, Generoso S V., Arantes RME, Correia MITD, Cardoso VN. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition* [Internet]. 2010;26(2):218–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.005>

31. Oliveira RP, Santiago AF, Ficker SM, Gomes-Santos AC, Faria AMC. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. *J Immunol Methods*. 2015;

32. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* [Internet]. 2014;514(7521):181–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13793>

33. Thaiss CA, Itav S, Rothschild D, Meijer MT, Levy M, Moresi C, et al. Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain. *Nature* [Internet]. 2016;540(7634):544–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature20796>

34. Fujisaka S, Bry L, Kahn CR, Fujisaka S, Ussar S, Clish C, et al. Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent Find the latest version : Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. 2016;126(12):4430–43.

35. Saldanha JCS, Gargiulo DL, Silva SS, Carmo-Pinto FH, Andrade MC, Alvarez-Leite JI, et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian J Med Biol Res*. 2004;37(6):809–16.
36. Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *Int Immunol*. 2000;12(12):1733–40.
37. Porto BAA, Monteiro CF, Souza ÉLS, Leocádio PCL, Alvarez-Leite JI, Generoso S V., et al. Treatment with selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 partially ameliorates mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2019;84(1):117–26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03865-8>
38. Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. *Cell Metab* [Internet]. 2011;14(1):67–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.013>
39. Petersson J, Schreiber O, Hansson GC, Gendler SJ, Velcich A, Lundberg JO, et al. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2010/11/25. 2011 Feb;300(2):G327–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109593>
40. Wang S, Xia P, Chen Y, Yin Z, Xu Z, Fan Z. Article Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell* [Internet]. 2017;171(1):201-216.e18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.027>
41. Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, Differentiation, and Diversity of Innate Lymphoid Cells. *Immunity*. 2014 Sep;41(3):354–65.
42. Esterházy D, Canesso MCC, Mesin L, Muller PA, de Castro TBR, Lockhart A, et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature* [Internet]. 2019;569(7754):126–30. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1125->

3

43. Faria a M, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol* [Internet]. 1999;73:153–264. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673363>
44. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunological Reviews*. 2011.
45. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille M. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1923–33.
46. Castro-Junior AB, Horta BC, Gomes-Santos AC, Cunha AP, Silva Steinberg R, Nascimento DS, et al. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. *Cell Immunol*. 2012;280(2):171–81.
47. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. 2008;57(6):1470–81.
48. Klopp P, Douin-echinard V. The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR  $\gamma$  t and Controls Metabolic Disease Clinical and Translational Report The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR  $\gamma$  t and Controls Metabolic Disease. 2015;100–12.
49. D N. Compartmentalized lymph node drainage dictates intestinal adaptive immune responses. *Res Q*. 2006;(September):464–75.
50. Rajpal DK, Klein JL, Mayhew D, Boucheron J, Spivak AT, Kumar V, et al. Selective spectrum antibiotic modulation of the gut microbiome in obesity and diabetes rodent models. *PLoS One*. 2015 Dec 1;10(12).
51. Sorini C, Cosorich I, Conte M Lo, De Giorgi L, Facciotti F, Lucianò R, et al. Loss of gut

barrier integrity triggers activation of islet-reactive T cells and autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(30):15140–9.

52. Miranda MCG, Oliveira RP, Torres L, Aguiar SLF, Pinheiro-Rosa N, Lemos L, et al. Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *J Leukoc Biol*. 2019;(June):513–29.

53. Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Adv Nutr*. 2016;7:66–75.

54. Dourado LPA, Noviello M de LM, Alvarenga DM, Menezes Z, Perez DA, Batista NV, et al. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cell Immunol [Internet]*. 2011;270(2):198–206. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.05.008>

55. Yamada LTP, de Oliveira MC, Batista NV, Fonseca RC, Sousa Pereira RV, Perez DA, et al. Immunologic and metabolic effects of high-refined carbohydrate-containing diet in food allergic mice. *Nutrition*. 2016;32(2):273–80.

56. Devereux G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: Food for thought. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):869–74.

57. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011;474(7351):327–36.

58. Butler SO, Btaiche IF, Alaniz C. Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients. *Pharmacotherapy*. 2005;25(7):963–76.

59. Leite SA, Locatelli SB, Niece SP, Oliveira AR, Tockus D, Tosin T. Impact of hyperglycemia on morbidity and mortality, length of hospitalization and rates of re-hospitalization in a general hospital setting in Brazil. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;2(1):1–6.

60. Hotamisligil GS, Shargill N, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-

- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* (80- ). 1993;259(5091):87–91.
61. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance [Internet]. Vol. 72, *Annual Review of Physiology*. 2010. 219–246 p. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-021909-135846>
62. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald M a, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* [Internet]. 2006;444(7122):1027–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183312>
63. Amar J, Serino M, Lange C, Chabo C, Iacovoni J, Mondot S, et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: Evidence for a concept. *Diabetologia*. 2011;54(12):3055–61.
64. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Neyrinck AM, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control metabolic diet–induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470–81.
65. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, et al. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab*. 2015;22(1):113–24.
66. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2011;11(7):445–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3007>
67. da Silva Menezes J, de Sousa Mucida D, Cara DC, Alvarez-Leite JI, Russo M, Vaz NM, et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol*. 2003;15(3):447–55.
68. Faria AMC, Reis BS, Mucida D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. *J Exp Med* [Internet]. 2017;214(5):1211–26. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20162014>

69. Hoytema van Konijnenburg DP, Reis BS, Pedicord VA, Farache J, Victora GD, Mucida D. Intestinal Epithelial and Intraepithelial T Cell Crosstalk Mediates a Dynamic Response to Infection. *Cell* [Internet]. 2017;171(4):783-794.e13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.046>
70. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G. Leptin: A pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* [Internet]. 2002;122(7):2011–25. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508502000343>
71. Kataoka H, Ohara M, Shibui K, Sato M, Suzuki T, Amemiya N, et al. Overweight and obesity accelerate the progression of IgA nephropathy: prognostic utility of a combination of BMI and histopathological parameters. *Clin Exp Nephrol*. 2012 Oct;16(5):706–12.
72. Vehkala L, Ukkola O, Kesäniemi YA, Kähönen M, Nieminen MS, Salomaa V, et al. Plasma IgA antibody levels to malondialdehyde acetaldehyde-adducts are associated with inflammatory mediators, obesity and type 2 diabetes. *Ann Med*. 2013 Dec;45(8):501–10.
73. Winer DA, Luck H, Tsai S, Winer S. The intestinal immune system in obesity and insulin resistance. *Cell Metab* [Internet]. 2016;23(3):413–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.003>
74. Cong Y, Feng T, Fujihashi K, Schoeb TR, Elson CO. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009;106(46):19256–61. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0812681106>
75. Luck H, Khan S, Kim JH, Copeland JK, Revelo XS, Tsai S, et al. Gut-associated IgA+ immune cells regulate obesity-related insulin resistance. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11370-y>
76. Karlsson EA, Beck MA. The burden of obesity on infectious disease. *Exp Biol Med* (Maywood). 2010;235(12):1412–24.

77. Graves CL, Li J, LaPato M, Shapiro MR, Glover SC, Wallet MA, et al. Intestinal epithelial cell regulation of adaptive immune dysfunction in human type 1 diabetes. *Front Immunol*. 2017;7(JAN):1–11.
78. Canesso MCC, Lemos L, Neves TC, Marim FM, Castro TBR, Veloso É, et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2018;11(3):820–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2017.88>
79. Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y, et al. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* (80- ). 2014;343(6178).
80. Ebbo M, Crinier A, Vély F, Vivier E. Innate lymphoid cells: Major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017;17(11):665–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.86>
81. Chun E, Lavoie S, Fonseca-Pereira D, Bae S, Michaud M, Hoveyda HR, et al. Metabolite-Sensing Receptor Ffar2 Regulates Colonic Group 3 Innate Lymphoid Cells and Gut Immunity. *Immunity* [Internet]. 2019;51(5):871-884.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.014>
82. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*. 2007;
83. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo C V., Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* [Internet]. 2007;204(8):1757–64. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20070590>
84. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp*

Med. 2006;203(3):519–27.

85. Houston SA, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat AM, Milling S. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct.

Mucosal Immunol. 2016;9(2):468–78.

86. Esterházy D, Canesso MCC, Mesin L, Muller PA, Castro TBR De, Lockhart A, et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune response. Nature.

2019;

87. Faria AMC, Ficker SM, Speziali E, Menezes JS, Stransky B, Verdolin BA, et al. Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. Brazilian J Med Biol Res. 1998;31(1):35–48.

88. Speziali EF, Menezes JS, Santiago AF, Vaz NM, Faria AMC. Lifelong Maintenance of Oral Tolerance and Immunity Profiles in Mice Depends on Early Exposure to Antigen. Scand J Immunol. 2018 Feb;87(2):73–9.

89. Vaz N, Faria AM, Verdolin BA, Carvalho CR. Immaturity, ageing and oral tolerance. Scand J Immunol. 1997 Sep;46(3):225–9.

90. Mucida DS, Rodríguez D, Castro Keller A, Gomes E, Silva Menezes J, Caetano De Faria AM, et al. Decreased nasal tolerance to allergic asthma in mice fed an amino acid-based protein-free diet. In: Annals of the New York Academy of Sciences. 2004.

91. Stephen-Victor E, Crestani E, Chatila TA. Dietary and Microbial Determinants in Food Allergy. Immunity [Internet]. 2020;53(2):277–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.025>

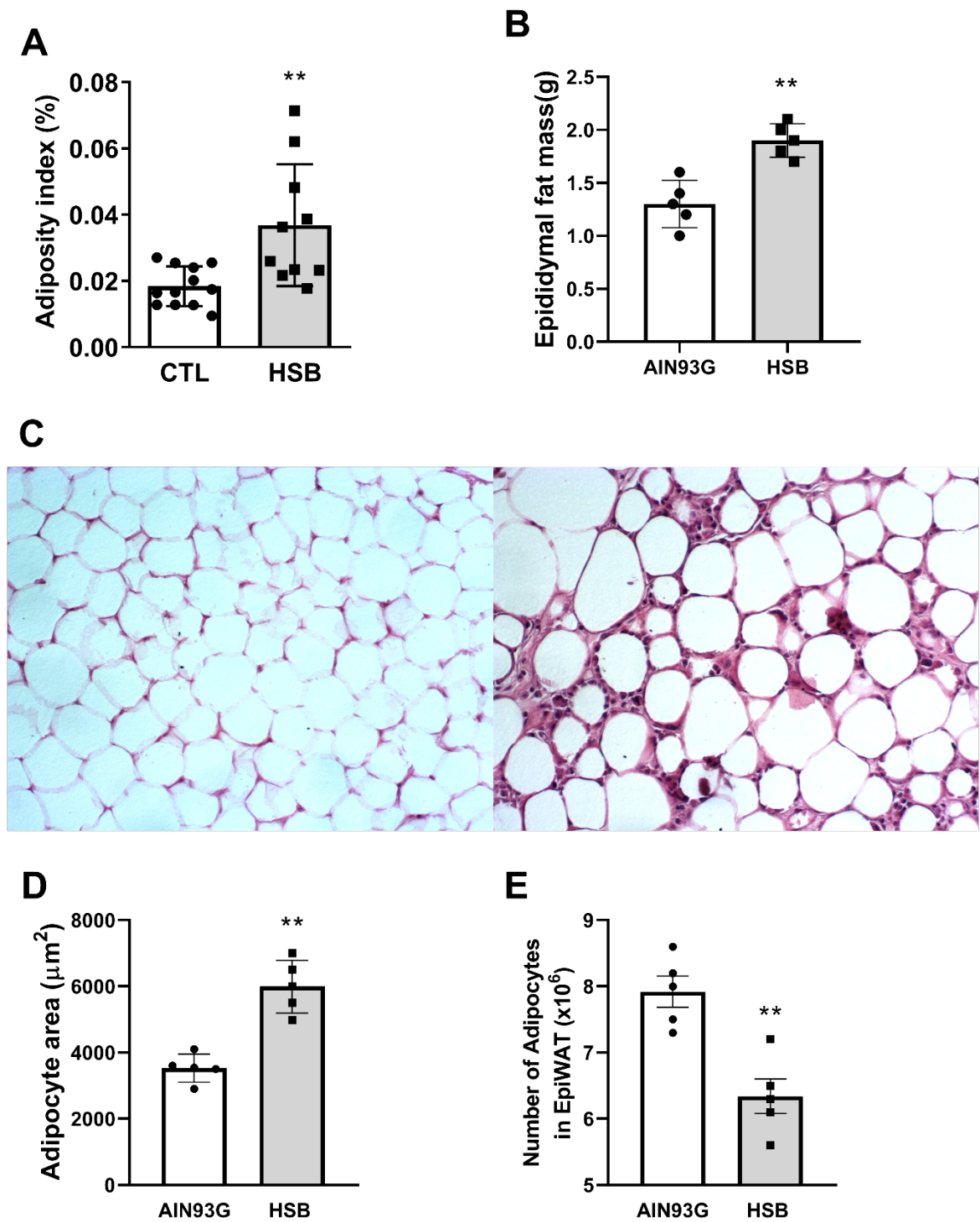
92. Faria AMC, Maron R, Ficker SM, Slavin AJ, Spahn T, Weiner HL. Oral tolerance induced by continuous feeding: Enhanced up-regulation of transforming growth factor- $\beta$ /interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Autoimmun. 2003;20(2):135–45.



93. Weiner HL. Oral tolerance: Immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 2001;3(11):947–54.
94. Oida T, Weiner HL. TGF- $\beta$  induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS One.* 2010;5(11):5–12.
95. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. 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. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 1992;89(1):421–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.1.421>
96. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. 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. *J Clin Invest [Internet].* 1996;98(1):70–7. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/118779>
97. Miller A, Lider O, Abramsky O, Weiner HL. Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals. *Eur J Immunol.* 1994;24(5):1026–32.
98. Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets [Internet].* 2006;5(3):179–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918481>
99. Beaufort C, Smyth D, McKay DM. Interferon- $\gamma$  Regulation of Intestinal Epithelial Permeability. *J Interf Cytokine Res [Internet].* 2009;29(3):133–44. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jir.2008.0057>
100. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression. 2011;6(3):1–13.

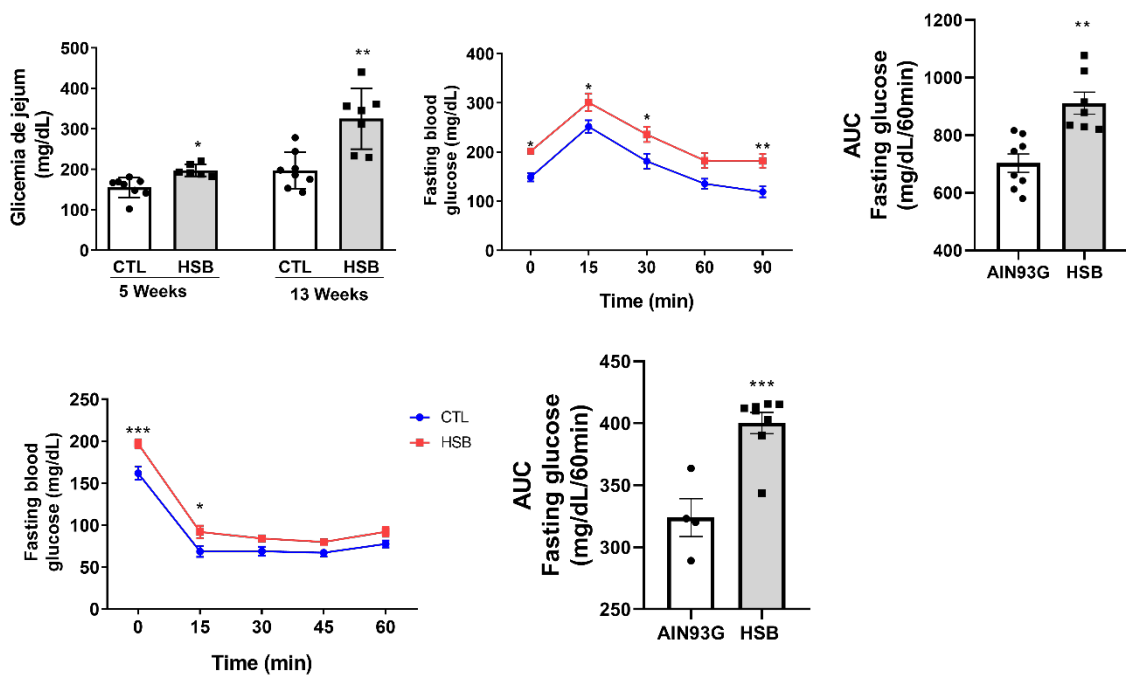
101. Miranda MCG, Oliveira RP, Torres L, Aguiar SLF, Pinheiro-Rosa N, Lemos L, et al. Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *J Leukoc Biol.* 2019;106(3):513–29.
102. Muller LMAJ, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AIM, et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis.* 2005;41(3):281–8.
103. Schachter LM, Peat JK, Salome CM. Asthma and atopy in overweight children. *Thorax.* 2003;58(12):1031–5.
104. Renz H, Allen KJ, Sicherer SH, Sampson HA, Lack G, Beyer K, et al. Food allergy. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4.
105. Wang H, Song Y, Sun S, Gao L, Liu L, Meng G, et al. Chinese cohort. *Metabolism* [Internet]. 2017;73:77–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2017.05.008>
106. Chen T, Liu X, Ma L, He W, Li W, Cao Y, et al. Food allergens affect the intestinal tight junction permeability in inducing intestinal food allergy in rats. *Asian Pacific J Allergy Immunol.* 2014;32(4):345–53.
107. De Rosa V, Procaccini C, Calì G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, et al. A Key Role of Leptin in the Control of Regulatory T Cell Proliferation. *Immunity.* 2007;26(2):241–55.
108. Shore SA, Schwartzman IN, Mellema MS, Flynt L, Imrich A, Johnston RA. Effect of leptin on allergic airway responses in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(1):103–9.

## Supplementary



Supplementary 1: The consumption of HSB diet induces weight gain and adipose tissue hypertrophy. C57BL/6 mice were fed for 13 weeks with either AIN93G (control - CTL) or HSB

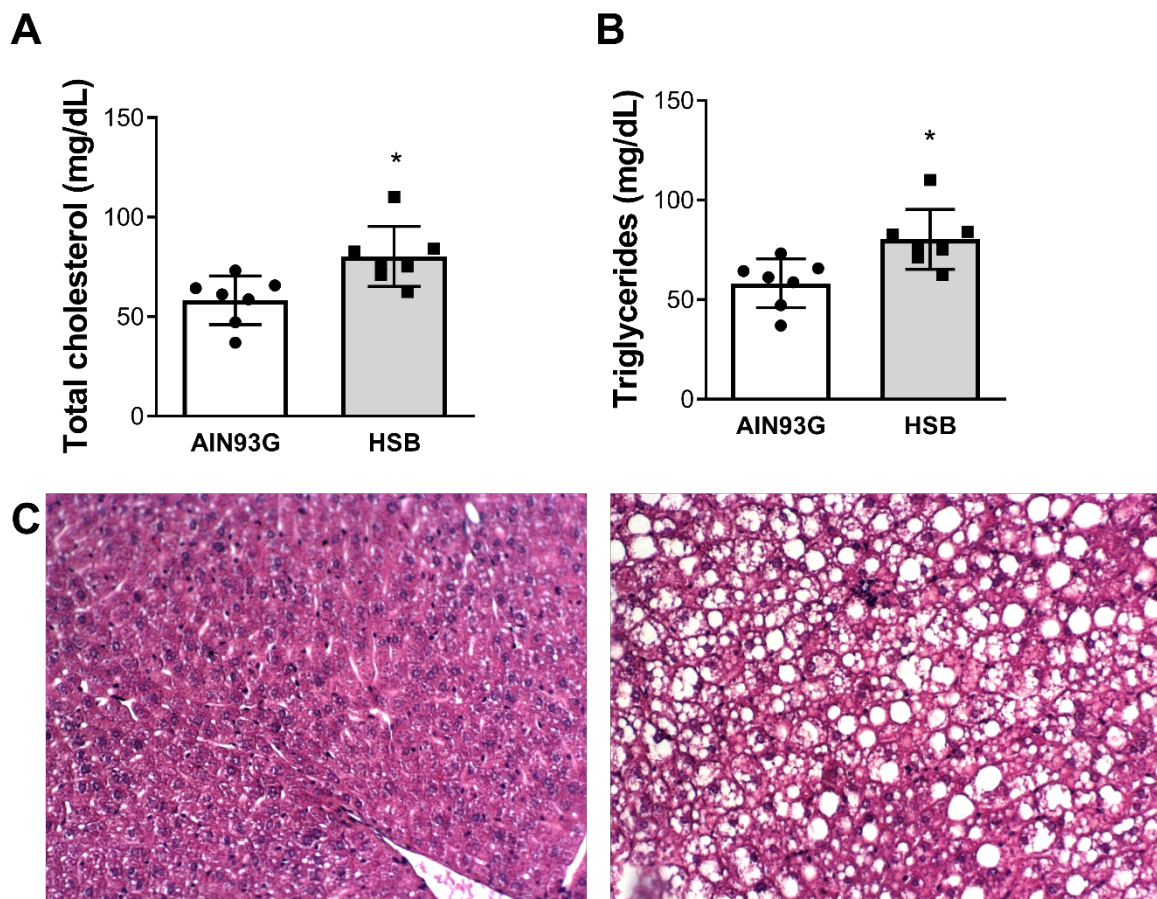
(experimental) diet. At the end of this period, the animals were sacrificed and the epididymal adipose tissue was isolated for evaluation of the adiposity index, expressed by the epididymal adipose tissue weight / body weight (A). Weight in grams of epididymal adipose tissue (B). On the left of Figure C is the panel representing the epididymal adipose tissue of mice treated with AIN93G diet and the right panel of animals treated with HSB diet. The arrow indicates the cellular infiltrate of the adipose tissue of the obese animals. (D) An adipocyte area performed using a 100 $\mu$ m scale bar, evaluated in 10 fields per animal (CTL, n = 10, HSB, n = 10). (E) Calculation of the number of adipocytes in the epididymal adipose tissue. Bars represent values (mean  $\pm$  SD) of a group (n = 10). \* p < 0.05 \*\* p < 0.01 \*\*\* p < 0.001 represent the statistically significant difference between the groups measured by the Student t test.



Supplementary 2: **Consumption of the HSB diet resulted in changes in the glucose response in mice.** Fasting blood glucose levels in the fifth and thirteenth weeks of treatment with the AIN93G (control - CTL) or HSB (experimental) diets were evaluated. (A) Oral glucose tolerance test was performed and blood glucose was measured at times 0, 15, 30, 60 and 90 minutes after glucose administration (B); and the area under the curve (AUC) was calculated; (C) Area under

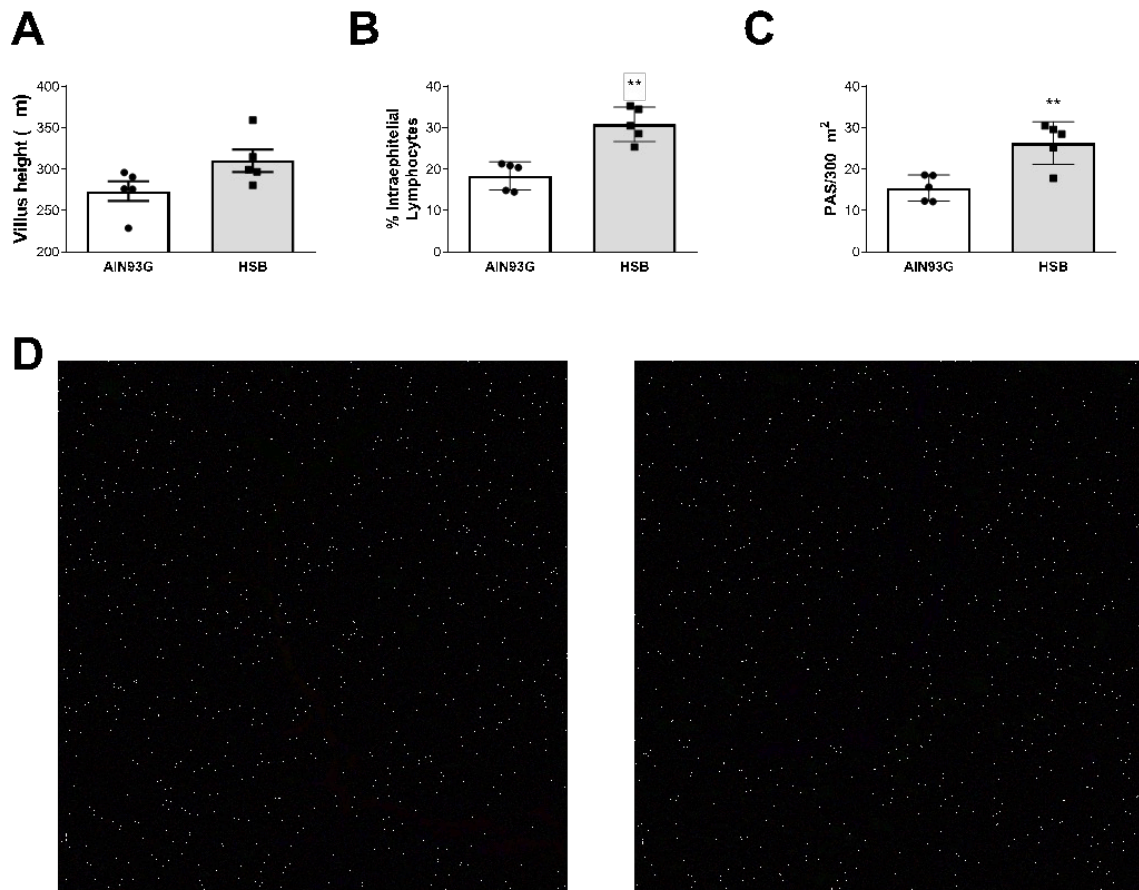
the curve of serum glucose concentration versus time (glucose tolerance test). (D) Insulin tolerance test was performed using NPH insulin at a concentration of 0.75UI/Kg of weight, blood glucose was measured at times 0, 15, 30, 45 and 60min. (E) Area under the curve obtained in the insulin tolerance test. Bars represent values (mean  $\pm$  SD) from a group (n = 7 or 8). (\*) represents the statistically significant difference between groups measured by Student's t test (\* $p$ <0.05 \*\* $p$ <0.01).

;



Supplementary 3: **Consumption of the HSB diet causes dyslipidemia in obese mice.** Serum levels of (A) total cholesterol and (B) serum triglycerides were evaluated by enzymatic assay in the thirteenth week of treatment with diet AIN93G or HSB (Control-CTL) or HSB (obese – HSB). Liver histology was obtained after 13 weeks of diet consumption, animals were euthanized and

liver fragments were removed for histological evaluation after staining with H&E (C). Bars represent values (mean  $\pm$  SD) of a group (n = 7). (\*) represents the statistically significant difference between groups measured by Student's t test (\* $p$ <0.05 \*\* $p$ <0.01).



**Supplementary 4: Intraepithelial lymphocyte frequencies and mucus production are increased in mice treated with HSB diet.** (A) Measurement of the length of small intestine villi of mice treated for 13 weeks with diet AIN93G (control - CTL) or HSB (experimental). Five villi were selected per histological section in 10 different sections, with a total of 50 villi per animal, results expressed as mean + standard deviation (n=10); (B) Frequency of intraepithelial lymphocytes in the duodenum of mice treated with AIN93G or HSB diet. The number was defined by counting IELs among the enterocytes of the duodenum of mice considering an interval of 500 enterocytes (n=10 animals per group). Count made after H&E staining at 20x magnification; (C) Graphic representation of the pixel intensity measure representative of the area stained by PSA To establish this value, the measures of all cells stained in 6 random fields per animal with 10x magnification were considered (n= 10 animals per group) ; (D) Representative histological image

of the colon showing the location of the goblet cells. The right panel represents the animals of the AIN93G group and the left HSB group. The bars represent the mean  $\pm$  standard deviation of the values obtained for each mouse in the group. (\*) represents the statistically significant difference between groups measured by

Student's t test (\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ ).

	Ob	Ob/IG
	n=30	n=30
<b>Age, years</b>	39,8 (9,45) 25-57	52,5 (11,21) 28-70
<b>Female, n (%)</b>	76,7% (23)	63,3% (19)
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>	43,9 $\pm$ 6,464	42,3 $\pm$ 7,39
<b>Fasting glycemia, mM</b>	4,77 $\pm$ 0,3538 <sup>a</sup>	9,86 $\pm$ 1,62 <sup>b</sup>
<b>HbA1c, %</b>	5,17 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	8,06 $\pm$ 1,19 <sup>b</sup>
<b>HOMA-IR</b>	2,89 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	8,75 $\pm$ 7,19 <sup>b</sup>
<b>IL-6</b>	4,07 $\pm$ 2,1	5,05 $\pm$ 3,3
<b>ADOPNECTINA</b>	4,93 $\pm$ 1,92	3,29 $\pm$ 1,16
<b>Tot Cholesterol, mM</b>	4,68 $\pm$ 1,02	4,53 $\pm$ 1,17
<b>TG, mM</b>	1,27 $\pm$ 0,5	2,09 $\pm$ 0,74
<b>IgE</b>	333,3 $\pm$ 47,74 <sup>a</sup>	978,4 $\pm$ 238,8 <sup>b</sup>

**Table 3: Clinical and biological parameters of the study cohort.** Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis performed using the Kruskal-Wallis test. Different letters (a, b) show statistical significance ( $P < 0.05$ ).