UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

FERNANDA FERNANDES TERRA

Papel da obesidade na rejeição ao transplante de pele experimental

SÃO PAULO
2019

FERNANDA FERNANDES TERRA

Papel da obesidade na rejeição ao transplante de pele experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Co-orientador: Dr. Rafael Ribeiro Almeida

Versão parcial

SÃO PAULO
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fernandes Terra, Fernanda
Papel da obesidade na rejeição ao transplante de
pele experimental / Fernanda Fernandes Terra;
orientador Niels Olsen Saraiva Câmara; coorientador
Rafael Ribeiro Almeida. -- São Paulo, 2019.
120 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. obesidade. 2. transplante. 3. rejeição. 4.
microbiota. I. Olsen Saraiva Câmara, Niels,
orientador. II. Ribeiro Almeida, Rafael,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Fernanda Fernandes Terra

Titulo da Dissertação/Tese: Papel da Obesidade na Rejeição ao Transplante de Pele Experimental

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
Co-orientador: Dr. Rafael Ribeiro Almeida

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

Aos meus avós Oswaldo Fernandes e Ari Terra, que
seguem vivendo em paz na minha saudade, e com
muito carinho na minha memória.

AGRADECIMENTOS

À minha Fé, por ser minha luz, guiar o meu caminho e me manter em pé. À Deus pela vida, pela família, pela saúde, por todas as pessoas cheias de luz que colocou na minha vida, pela oportunidade de fazer o que faço, por me fazer enxergar a verdade, a aceitar o que sou e por me permitir buscar meus objetivos. Aos meus anjos da guarda, São Miguel, São Gabriel e São Rafael, por nunca me abandonar, não me permitir sentir só e me proteger em todos os momentos.

À minha família, em especial aos meus pais, Virgílio e Andréia, desde sempre meus exemplos de amor, valores, força e persistência. Ao meu pai, Virgílio, por ser o melhor ser humano que eu conheço, por ser meu maior incentivador e por sempre caminhar ao meu lado (no mangue, na areia, na neve e em qualquer outro lugar sempre haverá dois pares de rastros). À minha mãe, Andréia, mesmo com toda a dor diária a senhora é sempre um exemplo de força, determinação e amor. Que Deus me permita algum dia dar o conforto e o alívio que a senhora merece! Às minhas irmãs, Samanta e Amanda, por ser minha base, acreditar em mim e ser meu maior suporte emocional. Ao meu avô Ari por seu amor e por me inspirar a ser o melhor que eu posso. Jamais me esquecerei do senhor beijando minha carteirinha da USP e o brilho no seu olhar quando eu entrei na faculdade, espero continuar sendo motivo de orgulho para o senhor! Aos meus priminhos Enzo, Duda e Dudu pela constante fonte de inspiração e força para lutar por um mundo melhor! Às minhas avós Ana e Dina, mesmo distantes sempre me apoiaram e me incentivaram. Aos meus familiares, em especial, minha madrinha de coração Tia Val, meus tios Gisele e Ricardo e minha prima e irmã de coração Letícia. Aos meus cunhados Elias e Danilo por me aturarem nos meus piores dias e pela compreensão da minha dependência emocional. O amor e apoio de toda a minha família foi essencial nessa jornada. Ao vô João, por ser uma inspiração e por me fazer lembrar o que realmente importa.

Ao Professor Niels, por ser a pessoa que o senhor é. Obrigada por todas as oportunidades e pelos bons momentos. Ao Rafa, meu co-orientador, por todo o apoio, atenção, orientação, cuidado e carinho ao longo do projeto. Obrigada por acreditar em mim, por partilhar dos sofrimentos da pesquisa no Brasil, por me ajudar nos exaustivos

tratamentos com antibióticos e por ter aceitado a difícil missão de me orientar! Aos meus co-orientadores não oficiais Marina e Vinícius. Marina, muito mais como uma irmã mais velha, você me ensinou muito de um jeitinho só seu que me fez gostar ainda mais da pesquisa. Vinícius, uma pessoa e um pesquisador incrível, obrigada por sempre me apoiar e incentivar, e por ter proporcionado minha “independência científica”. Sua orientação foi essencial para a minha formação!

Ao Gui e à Marcela, por serem meus irmãos científicos, ICs classe A e meus anjinhos da guarda na Terra. Gui, sem seu coração gigante e suas palavras sábias eu não teria conseguido finalizar mais essa etapa. Desde a IC nessa parceria, não tenho como agradecer pela amizade, ajuda nos experimentos, paciência e companheirismo. Jamais esquecerei as nossas reuniões extraoficiais no BIMMTE e nossas aventuras nos PAEs! Marcela, por ser uma amiga para todas as horas, por me aconselhar e entender tão bem, pela ajuda nos experimentos e na vida. Obrigada por ser um exemplo de mulher, feminismo e cientista! Quando eu crescer quero ser como você.

À Dra Heide, por me entender tão bem, por me salvar de mim mesma e por ter me permitido ser a pessoa que sou hoje. “O que é necessário para mudar uma pessoa é mudar sua consciência de si mesma” - Abraham Maslow

À Aline por além de ser uma ótima parceira de lab, ter um coração gigante, extremamente dedicada e sempre à disposição para ajudar. Obrigada pela amizade dentro e fora do lab. Agradeço também ao Pedro, por me receber de braços abertos no Canadá. Não tenho palavras para agradecer o quanto isso foi importante para mim naquele momento. À Cris Naffah, por ser uma pessoa tão iluminada e com uma energia tão boa que nunca me permitiu desistir e que sempre me incentivou! Obrigada pela amizade sincera, pela dedicação e pelo seu coração enorme. À Raquel, por não só me ajudar nos longos protocolos de tratamento nos finais de semanas, mas também pelo carinho e a ajuda. Ao meu querido ‘draguinha’ Thi. Obrigada por todo o apoio, conversas, risadas e conselhos, mesmo de bem longe você continua me trazendo a alegria e a calma necessária para seguir em frente. Ao Paulo, pelas conversas e desabafos da rotina de lab e, claro, por ter se tornado um amigo muito querido. À Flávia, pela ajuda e por me ajudar a manter a sanidade e o foco nos últimos meses.

Às pitocas, Evy, Aline, Mari Mari, Mari M e Nathi, por todas as conversas e desabafos, choros e risadas, pelo incentivo constante, por me lembrar de que eu ainda tenho uma vida para viver, pela companhia e pela amizade pura e verdadeira de tantos anos. Às minhas amigas de longa data, Erika e Dani, as conversas do mundo fora da pesquisa me fizeram desligar do mundo real e dos problemas várias vezes. Obrigada pela amizade e companheirismo. Ao Vanderlei, por ter sido essencial para meu ingresso precoce na ciência, obrigada pelo incentivo. Não sei se teria chegado nesse ponto sem seu conselho!

Aos amigos que o LIT me deu desde 2013: Cris A, Angela, Lis, Mary, Matheus, Reinaldo, Tércio, Taty, Camila, Amanda, Victor Y, Felipe, Marcelli. Em especial, à Cris N, Marcela, Raquel e Flávia pela enorme ajuda nos últimos meses não só nos experimentos, mas pela amizade e apoio emocional essencial à finalização dessa tese! A todas as gerações de colegas de LIT Bruno, Omar, Jean, Matheus, Marcella, Daniel, Tom, Daniel, Iza, Iris, Elô, Nat Hiromi, Marina Barguil, Nat Tejada, Adalberto, Claudinha, Tom, Greice, Tay, Bárbara, Mariana, Vivien, Victor pela convivência e bons momentos.

À Meire pela ajuda no laboratório e pelo carinho que sempre teve comigo. Apesar de quase me deixar surda, você tem um coração enorme e é uma verdadeira mãe para todos no lab. Obrigada por ter me recebido tão bem e por todo o carinho ao longo dos anos.

Ao Mário, ao Fernando, à Jô e ao Paulo Albe, pela atenção com os experimentos.

À Amandda e à Heloísa, pela ajuda no CEDEME.

À Eni e ao João, pela ajuda em todos os assuntos relacionados à pós-graduação e por sempre estarem dispostos a ajudar da melhor maneira possível.

A todos os senhores da portaria do ICB IV pelas conversas e companhia nos finais de semana, pelo carinho, incentivo e apoio desde 2013. À equipe de limpeza, em especial Salete e Neide pela agradável companhia, pelas conversas na copa de manhã cedinho e pelo carinho ao longo dos anos.

I am thankful for the time I spent at University of Calgary. I thank Markus Geuking and Kathy McCoy for having me at their lab and for all the experience, opportunities and knowledge shared. I also thank to all lab members for the kind moments at the lab. Ao Fernando e à Dine, por terem me hospedado sem nem me conhecerem, por terem se

tornado uma família durante a minha aventura canadense e pela amizade. Espero um dia conseguir retribuir tudo que vocês fizeram por mim!

Aos colegas da pós-graduação pelo convívio durante as disciplinas.

Aos professores e funcionários do ICB.

Aos camundongos utilizados na pesquisa, obrigada por ser parte essencial no desenvolvimento da ciência básica.

ENTIDADES DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos 2012/02270-2, 2014/14147-6, 2017/03248-4, 2017/05264-7, 2018/06152-0), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 130001/2017-1) e da Coordenação de Aperfeiçoamentos de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código de financiamento 001).

"I had never watched things before, and it made me feel very curious. I keep saying to myself, 'What is it? What is it?' It's something. I don't know its name, so I call it Magic. Everything is made out of Magic (...) but people don't know what it is like or how to make it."

The Secret Garden, Frances Hodgson Burnett

RESUMO

TERRA, FF. **Papel da obesidade na rejeição ao transplante de pele experimental.** 2019. 120f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A obesidade é considerada um problema de saúde pública no Brasil, sendo associada a várias comorbidades crescentes nas últimas décadas e à inflamação crônica de baixo grau. Em razão disto, acredita-se que pacientes obesos estejam mais propensos a precisar de algum tipo de transplante ao longo da vida. No entanto, a contribuição da obesidade no contexto da rejeição de órgãos sólidos ainda é controversa. A rejeição ao enxerto continua a ser uma das principais complicações para os pacientes transplantados. Neste sentido, nós formulamos a hipótese de que a obesidade acelera a rejeição ao órgão transplantado por modular a resposta alogênica, favorecendo um perfil mais pró-inflamatório. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da obesidade na rejeição ao transplante alogênico. Para tanto, induzimos a obesidade por dieta hiperlipídica (DH) durante 12 semanas em camundongos machos C57BL/6. Demonstramos que animais DH apresentam ganho de peso superior em comparação aos animais em dieta padrão (DP), além de desenvolverem intolerância à glicose. Avaliando o efeito da obesidade induzida por dieta na resposta aloimune pela transferência de pele da cauda de camundongos machos F1 (C57BL/6 x Balb/c, H-2^{b/d}) ou C57BL/6 (H-2^b) para o dorso de receptores DH e DP (H-2^b), observamos que os DH rejeitam o enxerto semi-alogênico de pele mais rapidamente que os DP, sem interferir no transplante singênico. Essa rejeição precoce foi acompanhada pelo aumento na expressão gênica de *il-17a* nos linfonodos drenantes, bem como pela produção aumentada de IL-17A por células T CD4⁺, sem alteração na produção de IFN- γ . Observamos também redução na população de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nos linfonodos drenantes dos animais DH. Ademais, observamos aumento na ativação das células dendríticas desses animais em relação aos DP nos linfonodos drenantes e no baço. Tendo em conta o papel da microbiota como um potencial modulador do sistema imune e respostas aloimunes, avaliamos sua contribuição no contexto da rejeição ao transplante. O tratamento de animais magros com antibióticos de amplo espectro antes do transplante reduziu a sobrevida do enxerto somente quando doador e receptor são tratados, porém por mecanismos ainda não estabelecidos. Contudo, o tratamento de animais obesos foi capaz de retardar a rejeição alogênica, em relação a obesos não tratados. O retardo na rejeição nos obesos tratados foi acompanhado pela redução na resposta de células T_H17. Assim, estes resultados indicam que a obesidade tem impacto negativo no desfecho do transplante e isto pode decorrer, ao menos parcialmente, da disbiose associada à obesidade.

Palavras-chave: Obesidade. Transplante. Rejeição. Microbiota.

ABSTRACT

TERRA, FF. **The role of obesity in experimental skin transplant rejection.** 2019. 120s. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Obesity is a public health problem in Brazil, it is associated with multiple increased comorbidities in recent decades and it also promotes chronic low-grade inflammation. For this reason, it is believed that obese patients are more likely to need some transplant throughout life. However, the contribution of obesity in organ transplant rejection remains contentious. Graft rejection persists as the major complication to transplanted patients. Then, we hypothesized that obesity accelerates graft rejection through modulating allogeneic response by favouring a proinflammatory profile. Thus, our aim was to evaluate the impact of obesity in allogeneic transplant rejection. We have induced obesity feeding male C57BL/6 mice with a high-fat diet (DH) for 12 weeks. We demonstrated that DH animals had superior weight gain compared to standard diet (DP), in addition to developing glucose intolerance. To evaluate the effect of diet-induced obesity on alloimmunity, we transferred the tail skin from male F1 (C57BL/6 x Balb/c, H-2^{b/d}) or C57BL/6 (H-2^b) mice to the back of DH and DP recipients. DH mice rejected semi-allogeneic skin grafts faster than DP, without interfering in syngeneic transplantation. This early rejection was accompanied by increased *il-17a* mRNA expression in the draining lymph nodes, as well as increased production of IL-17A by CD4⁺ T cells with no difference in IFN- γ production. Graft rejection in obese mice was also correlated with a reduction in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells in the draining lymph nodes and an increase in dendritic cells activation when compared to DP mice. Considering the role of the microbiota as a potential modulator of the immune system and alloimmune responses, we evaluated its contribution in the context of transplant rejection. Treatment of lean mice with broad-spectrum antibiotics prior to transplantation reduced graft survival only when donor and recipient were treated. The mechanisms underlying this phenomenon need further investigation. However, treatment of obese mice was able to delay allogeneic rejection over untreated obese subjects. Graft rejection delay in antibiotic-treated obese mice was followed by a contraction on T_H17 response. Thus, these results indicate that obesity has a negative impact on the outcome of the transplantation and this can be at least partially due to the obesity-related dysbiosis.

Keywords: Obesity. Transplantation. Rejection. Microbiota.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transplante de órgãos sólidos

O transplante de órgãos sólidos é, atualmente, a melhor opção terapêutica para pacientes com falência ou insuficiência funcional de órgãos essenciais. A lista de pacientes à espera de um transplante cresce exponencialmente a cada ano, porém o número de doadores efetivos não tem acompanhado tal crescimento. No Brasil, a taxa de transplantes renais não cresce há sete anos e, no primeiro trimestre de 2019, houve queda nos transplantes pulmonar, renal e hepático (1). Embora seja observado aumento da sobrevida do enxerto e na qualidade de vida de pacientes crônicos com doenças renais e cardíacas após o transplante (2, 3), a persistência de altos índices de rejeição e disfunção crônica do enxerto persiste como um dos principais obstáculos à manutenção dos enxertos.

Embora existam modelos experimentais de transplante entre espécies diferentes (xenotransplantes), na clínica os transplantes são realizados somente entre indivíduos da mesma espécie. Dentre estes, o transplante alogênico é o mais comum, por ser realizado entre indivíduos geneticamente distintos, aparentados ou não aparentados. O transplante singênico, por sua vez, ocorre quando doador e receptor são geneticamente idênticos, como no caso de gêmeos univitelinos e, por essa razão, não são tão comuns. Há ainda o transplante autólogo ou autotransplante, quando o enxerto é proveniente do próprio receptor, como no caso de queimaduras extensas e ponte de safena. Nos transplantes singênico e autólogo não há diferença antigênica e, por isso, não se espera observar resposta imune do receptor frente ao material transplantado. Nos transplantes alogênicos, por sua vez, as diferenças genéticas entre doador e receptor desencadeiam uma resposta imune contra o enxerto que, em última instância, pode levar à rejeição do órgão transplantado.

A imunologia de rejeição ocupa um ponto central na busca ao aumento da sobrevida de transplantes. Nesse contexto, a habilidade do sistema imune em discriminar antígenos próprios dos não próprios é denominada alorreconhecimento e refere-se à identificação e consequente resposta do sistema imune do receptor diante diferenças antigênicas (aloantígenos) entre o enxerto e o receptor (4). Assim, o alorreconhecimento, na ausência de imunossupressão, promoverá a rejeição do órgão transplantado.

A resposta ao aloenxerto é, fundamentalmente, mediada pelo sistema imune adaptativo, no qual células T (em sua maioria) e B alorreativas do receptor são ativadas após o reconhecimento de aloantígenos do doador. Os aloantígenos responsáveis pela rejeição do enxerto são chamados antígenos de histocompatibilidade e compreendem antígenos menor de histocompatibilidade (5), antígenos ABO (6), entre outros. Contudo, as principais diferenças antigênicas reconhecidas pela imunidade adaptativa do receptor são os produtos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*).

1.1.1. Complexo principal de histocompatibilidade

Descobertos na superfície dos leucócitos, as moléculas MHC ficaram conhecidas como antígenos leucocitários, motivo pelo qual o MHC de humanos é chamado HLA (do inglês *Human Leukocyte Antigen*), enquanto em camundongos possuem a denominação H-2. Alocado no cromossomo 6 em humanos e no cromossomo 17 em camundongos, esse complexo gênico é organizado em regiões que codificam 3 classes de moléculas, as quais são denominadas MHC classe I, II e III (7). Enquanto as classes I e II codificam glicoproteínas de superfície celular envolvidas na apresentação de antígenos, a classe III gera proteínas solúveis com atividades variadas sem relação direta com a rejeição alogênica (8).

O *locus* classe I codifica as moléculas MHC classe I, formadas pela associação não covalente de uma cadeia α com a β 2-microglobulina, que são expressas em todas as células nucleadas. Cada *locus* do MHC classe I, HLA-A, HLA-B e HLA-C em humanos, codifica uma única cadeia α polipeptídica que apresenta três domínios extracelulares (α 1, α 2 e α 3), uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática que ancora essa proteína na bicamada lipídica da célula. A β 2-microglobulina, por sua vez, é codificada por um gene no cromossomo 15, fora do complexo principal de histocompatibilidade, e é essencial para a expressão das moléculas MHC classe I na superfície celular (9). Os domínios α 1 e α 2 formam a fenda, na qual peptídeos com tamanho variável entre 8 e 10 resíduos de aminoácidos oriundos do citosol se encaixam e podem ser apresentados, principalmente, para as células T CD8⁺ citotóxicas (10).

O *locus* classe II, por sua vez, codifica as moléculas MHC classe II, expressas

constitutivamente em células apresentadoras de antígenos profissionais (APC, do inglês *antigen presenting cells*), como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas. Tais moléculas são formadas pela associação não covalente de uma cadeia α e uma cadeia β , ambas codificadas no mesmo *locus*. Em humanos existem 5 moléculas MHC classe II distintas, HLA-DP, HLA-DN, HLA-DO, HLA-DQ e HLA-DR, cada uma com sua própria cadeia α e β . Cada cadeia apresenta uma porção transmembrana, uma cauda citoplasmática e dois domínios extracelulares ($\alpha 1$ e $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$) (11). Os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ formam uma fenda aberta nas extremidades, na qual peptídeos de 13 a 24 aminoácidos, provenientes da internalização e degradação de proteínas, podem se ligar e serem apresentados, especialmente, para as células T CD4⁺ (12).

Os genes que constituem o MHC são herdados em conjunto, formando um haplótipo, sendo que a prole recebe um haplótipo de cada progenitor. Além disso, a expressão desses genes é codominante, ou seja, produtos proteicos de ambos os genes parentais são encontrados em uma única célula (13). Como há três *loci* do MHC classe I (HLA-A, -B e -C), um único indivíduo pode formar até seis moléculas MHC classe I diferentes, sendo que todas podem ser expressas na superfície de células nucleadas. De maneira semelhante, há três *loci* principais de MHC de classe II em humanos (HLA-DP, -DQ e -DR), cada qual codifica duas cadeias e são herdados de ambos os parentais. Como há mais de um gene para a cadeia β no HLA-DR e suas cadeias podem se associar dentro de um mesmo haplótipo parental ou combinar as cadeias entre os haplótipos (um gene de cada progenitor), há ainda mais variabilidade de moléculas MHC classe II que podem ser encontradas na superfície de APC.

Somado a isso, uma das principais características do MHC é seu alto grau de polimorfismo. A presença de vários genes codificando um mesmo produto e a existência de muitas formas alternativas de genes em cada *locus* dentro da população torna possível a denominação do MHC como geneticamente único (14, 15). A presença de uma grande variedade de moléculas MHC possibilita que um indivíduo apresente vários antígenos distintos e, assim, seja capaz de montar uma resposta imune efetiva para combater um patógeno. Por outro lado, a possibilidade de que um transplante seja bem-sucedido deve-se, em grande parte, ao grau de compatibilidade entre doador e receptor quanto às moléculas MHC.

1.1.2. Alorreconhecimento e rejeição alogênica

O risco de pacientes desenvolverem rejeição é proporcional ao grau de diferença dos antígenos de histocompatibilidade entre doador e receptor (16-18). Dois estudos clínicos independentes demonstraram que a compatibilidade do HLA-A no transplante renal está associada a maior sobrevida do enxerto e do paciente (19, 20). Apesar da identidade do MHC entre doador e receptor estar associada à melhora no desfecho do transplante e à menor sensibilidade antigênica, a busca pela máxima similaridade reduz a probabilidade do paciente encontrar um doador compatível e isso, por sua vez, tem implicação direta na sobrevida do paciente. Dessa forma, um balanço entre o grau mínimo e o desejável de similaridade mostra-se necessário, em que eventualmente algumas diferenças sejam aceitáveis, porém minimizando a resposta imune do receptor (14). Consequentemente, a compreensão de potenciais fatores externos que podem influenciar na sobrevida dos aloenxertos é de extrema importância.

A presença das moléculas MHC em todas as células nucleadas, a capacidade de interagir com o receptor da célula T (TCR, do inglês *T cell receptor*), bem como sua alta variabilidade genética tornam-nas centrais no alorreconhecimento (21). Existem duas vias principais de alorreconhecimento (Imagem 1), a via direta e a indireta, não mutuamente excludentes, que podem agir simultaneamente ou em contextos diferentes do transplante (22). A via direta ocorre quando linfócitos T do receptor, por meio do TCR, reconhecem aloantígenos, principalmente complexos peptídeo-MHC do doador, diretamente na superfície de células do doador. Acredita-se que esse tipo de alorreconhecimento desempenhe papel mais relevante no período pós-transplante precoce, sendo associado com a presença de APC do doador no enxerto. Com o tempo, haveria redução numérica dessas células no receptor, sugerindo menor participação dessa via em longo prazo (23).

Na via indireta, por sua vez, APC do receptor capturam e processam moléculas MHC classe I e II alogênicas e as apresentam na forma de peptídeos por meio do MHC classe II próprio (24). Esse tipo de alorreconhecimento é muito similar à forma como o sistema imune normalmente reconhece os antígenos, que são processados pela APC do hospedeiro e apresentadas no contexto do MHC próprio. Como as células apresentadoras são do receptor, acredita-se que essa via desempenhe papel mais relevante na rejeição crônica, quando há

menor quantidade de APC do doador (25).

Imagem 1. Vias de reconhecimento. A via direta consiste na apresentação de complexos peptídeo-MHC nas células apresentadoras de antígenos do doador para células T CD4⁺ e CD8⁺ do receptor. As células T CD4⁺ proliferam e produzem citocinas que induzem o dano tecidual, enquanto células T CD8⁺ respondem aos antígenos presentes no enxerto, diferenciam-se em linfócitos T citotóxicos capazes de destruir diretamente as células do enxerto. A via indireta envolve o processamento de aloantígenos do doador pelas células apresentadoras de antígenos do receptor, as quais apresentam os aloantígenos do doador no MHC do receptor para os linfócitos T. Nessa via, antígenos do enxerto ativam células T CD4⁺ e CD8⁺, além de estimular linfócitos B para produzir anticorpos. Imagem adaptada de Kumar *et al.* Robbins Basic Pathology, 8e.

Apesar do reconhecimento, via TCR, do aloantígeno apresentado pelas moléculas MHC ser essencial ao desenvolvimento da resposta efetora, ainda são necessários outros sinais para que essa célula T alorreativa seja plenamente ativada. O primeiro sinal, interação entre um antígeno específico acoplado à molécula MHC e o TCR do linfócito, deve resultar em uma ligação estável e, ao mesmo tempo, precisa ser auxiliada pelos correceptores do respectivo

linfócito ($CD4^+$ ou $CD8^+$). Mesmo após a ligação dos correceptores, o linfócito T não é capaz de proliferar e precisa de mais dois sinais que, geralmente, são provenientes da mesma célula apresentadora, portadora do MHC ligado ao TCR. Já o segundo sinal deriva de moléculas co-estimuladoras, como CD80 e CD86, que promovem a sobrevivência e, também, a expansão das células T, as quais reconhecem as moléculas co-estimuladoras por meio do receptor de membrana CD28 (26, 27). E o terceiro sinal necessário para a ativação do linfócito T ocorre a partir de citocinas produzidas pela própria célula apresentadora ou presentes no microambiente e que direcionam esse linfócito para subpopulações específicas (T_H1 , T_H2 , T_H17 ou T reguladora) (28), entre elas, a IL-2 (29).

1.1.3. Tipos de rejeição ao transplante

Para efeito didático, o processo de rejeição pode ser dividido em três diferentes situações em função do tempo decorrido entre o momento do transplante e o enxerto ser completamente rejeitado, bem como em função dos mecanismos imunológicos subjacentes ao processo de rejeição. Assim, a rejeição é classificada em hiperaguda, aguda e crônica (Imagem 2).

A rejeição hiperaguda ocorre em questão de minutos ou horas após o procedimento e deve-se à preexistência de anticorpos específicos para antígenos do enxerto (30). Esse tipo de rejeição ocorre principalmente em pessoas com incompatibilidade no sistema sanguíneo ABO, múltiplas gestações, hipersensibilizadas ou que já foram transplantadas. Em todas essas situações, os indivíduos foram previamente expostos a aloantígenos e, assim, a nova exposição no momento do transplante pode promover consequências imediatas. Nesses casos, os anticorpos se ligam ao enxerto e ativam o sistema complemento, que recruta principalmente neutrófilos que irão promover inflamação exacerbada, levando ao dano endotelial, trombose, não vascularização do enxerto e, conseqüentemente, sua perda (31). Contudo, este tipo de rejeição não é visto comumente na clínica devido à disponibilidade de pré-testes de compatibilidade (32).

Imagem 2. Tipos de rejeição ao transplante. (A) Na rejeição hiperaguda, anticorpos previamente formados reagem com aloantígenos presentes no endotélio vascular do enxerto, ativam o complemento e desencadeiam trombose intravascular rápida e necrose da parede dos vasos. (B) Na rejeição aguda, linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ reativos aos aloantígenos presentes em células endoteliais e parenquimatosas do enxerto medeiam o dano tecidual. A inflamação do endotélio é chamada endotelite. Anticorpos alorreativos também podem contribuir para a lesão parenquimatosa e vascular. (C) Na rejeição crônica, as células T $CD4^+$ e $CD8^+$ reativas aos aloantígenos presentes no enxerto podem produzir citocinas que induzem a inflamação e proliferação de células musculares da camada íntima, levando à oclusão luminal. Imagem adaptada de Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology, 7e.

A rejeição aguda, mais comum dentre as três, ocorre prioritariamente nas primeiras semanas após o transplante e é mediada, principalmente, por células T $CD8^+$ citotóxicas ativadas com auxílio de células T $CD4^+$ de padrão T_H1 e T_H17 . Considera-se que a rejeição aguda esteja relacionada principalmente à via direta de apresentação de antígenos (33) a

qual ocorre quando moléculas MHC classes I e II expostas em APC do doador são reconhecidas diretamente por linfócitos T do receptor $CD8^+$ e $CD4^+$, respectivamente (34). Com isto, há ativação de linfócitos T $CD4^+$ em um padrão T_H1 e T_H17 (35) que, junto a outras células, passam a secretar citocinas pró-inflamatórias (36) que auxiliam na ativação de linfócitos T $CD8^+$ efetores que, por sua vez, passam a liberar moléculas citotóxicas, levando as células do tecido transplantado à morte por apoptose. Concomitantemente, a ativação de células B também leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias e de anticorpos contra aloantígenos presentes no enxerto.

Considerando a rejeição crônica, esta também é mediada por processos celulares e humorais. Juntamente com a nefrotoxicidade por drogas, lesões por envelhecimento e infecções, a rejeição crônica contribui para o quadro de disfunção crônica do enxerto, resultando na principal causa de perda do enxerto atualmente. Em contraste à rejeição aguda, a rejeição crônica está diretamente relacionada à via indireta de apresentação de antígenos (37). Nesta, APCs do receptor processam aloantígenos do doador, apresentando-os via MHC de classe II e classe I a linfócitos T do receptor, os quais passam a secretar citocinas, como $IFN-\gamma$, que serão capazes de ativar células da imunidade inata, como macrófagos, monócitos e neutrófilos. As células da imunidade inata, por sua vez, passam a liberar citocinas, como $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$, e espécies reativas de oxigênio, culminando em um processo inflamatório capaz de estimular células parenquimatosas como fibroblastos e células musculares, bem como promover hipertrofia muscular dos vasos locais e fibrose tecidual, além de potencializar o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão (34). As citocinas podem ainda ativar os linfócitos B, que irão produzir anticorpos contra o enxerto. Esses anticorpos são capazes de fixar complemento intravascular causando liberação de anafilatoxinas, lesão do endotélio vascular, hemorragia, agregação plaquetária e trombose com lesão lítica das células do órgão transplantado. A rejeição crônica é o resultado final dessa agressão gradual e progressiva ao enxerto, com isquemia tecidual e fibrose, que, por sua vez, leva à perda funcional do órgão e, consequentemente, sua falência.

Historicamente, a compreensão da imunobiologia dos transplantes, envolvendo os mecanismos de componentes imunológicos, genéticos e ambientais na rejeição mostrou-se altamente dependente de modelos experimentais. Apesar de suas limitações na prática

clínica, o transplante experimental murino é um modelo bastante útil para estudar a resposta alo gênica. Dentre os modelos atualmente disponíveis, o transplante de pele persiste como um método rápido e fácil para monitorar respostas T alogênicas, sendo amplamente utilizado para estudar mecanismos de rejeição aguda e crônica, e avaliar a eficácia e eficiência de agentes imunossupressores e protocolos de indução de tolerância (38). Em comparação a modelos de transplantes vascularizados, o transplante de pele consiste em um procedimento cirúrgico mais simples e reprodutível. Além disso, este também apresenta maior imunogenicidade (39) e menor tempo de rejeição quando comparado a outros modelos experimentais (40, 41), tais como coração e rim.

Apesar da existência de técnicas avançadas na determinação de compatibilidade alogênica, bem como do crescente desenvolvimento de agentes imunossupressores efetivos, a sobrevida dos enxertos em longo prazo é ainda limitada pela persistência de altos índices de rejeição crônica, devido aos importantes efeitos colaterais associados à toxicidade dos agentes e pela susceptibilidade do paciente a infecções oportunistas. Dessa forma, é de extrema importância estudar os mecanismos subjacentes à resposta do receptor ao aloenxerto, focando na pesquisa de novas intervenções para prolongar a viabilidade do enxerto e aumentar a sobrevida do paciente.

1.2 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica multifatorial que pode ser definida como o acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal. Comumente classificada com base no índice de massa corporal (IMC), o qual se baseia na razão entre a massa e a altura do indivíduo, o sobrepeso é caracterizado como IMC entre 25 e 29,9 kg/m² e a obesidade quando superior a 30 kg/m², num indivíduo adulto. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2016 estimava-se que 56,5% da população brasileira estava no sobrepeso e 22,1% era obesa (42). O aumento epidêmico mundial nos índices de obesidade nas últimas décadas tem levantado importante debate acerca do papel da obesidade na saúde e sua influência em diversas comorbidades encontradas na população (43).

Ao longo dos anos, diversos estudos associaram a obesidade com alterações na resposta imune tanto no tecido adiposo, quanto a nível sistêmico (44-46). Atualmente reconhecida

como um quadro de inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo, a obesidade pode ser detectada pela elevação de marcadores e citocinas inflamatórias, além da presença de macrófagos pró-inflamatórios infiltrados no tecido adiposo de indivíduos obesos (47). Apesar de nem todos os mecanismos estarem esclarecidos, há evidências que esse estado inflamatório esteja relacionado a diversos distúrbios como resistência à insulina, diabetes e, conseqüentemente, síndrome metabólica (43). Nos últimos anos, o entendimento da patogênese dessas comorbidades em pacientes obesos tem perpassado pela resposta inflamatória do tecido adiposo, considerado hoje um importante órgão endócrino metabolicamente ativo.

Acredita-se que com o ganho de peso e hipertrofia dos adipócitos haja compressão dos vasos sanguíneos no tecido adiposo, impedindo um suprimento adequado de oxigênio. Ocorreria, então, hipóxia local e morte de alguns adipócitos (48). Esse quadro desencadearia a cascata da resposta inflamatória e também o processo de angiogênese, para formação de novos vasos. Portanto, a condição de hipóxia seria um dos principais fatores responsáveis por estimular a quimiotaxia de macrófagos e induzir a expressão de genes pró-inflamatórios (49-52). A elevação dos marcadores inflamatórios observados na obesidade seria proveniente, portanto, da produção destes pelos próprios adipócitos e pelos macrófagos infiltrados em resposta à hipóxia. De igual modo, há também liberação de mediadores inflamatórios em outros órgãos, muitas vezes com produção estimulada por fatores secretados no tecido adiposo. Entretanto, a inflamação tecidual aparece como resposta não só a hipóxia, mas também ao estresse oxidativo (53) e ao estresse do retículo endoplasmático (54).

A obesidade, *per se*, pode induzir estresse oxidativo sistêmico e o aumento do estresse na gordura acumulada é, ao menos em parte, a causa subjacente da desregulação de adipocinas e desenvolvimento da síndrome metabólica (53). A obesidade gera condições que aumentam a demanda do retículo endoplasmático. No caso específico do tecido adiposo, este sofre grandes alterações em sua arquitetura, aumentando a síntese de proteínas e lipídeos, e perturbando os fluxos de energia e nutrientes intracelulares (55). Além disso, o aumento do aporte de glicose no tecido adiposo, com conseqüente captação pelas células endoteliais em condições de hiperglicemia, provoca excesso de produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, causando dano oxidativo e ativando cascatas de

sinalização inflamatórias dentro dessas células. Adiante, a lesão endotelial no tecido adiposo também pode atrair células inflamatórias, tais como macrófagos para esse local e exacerbar a inflamação local (33).

1.2.1. Inflamação ligada à obesidade

Existem três vias principais pelas quais o tecido adiposo se comunica com o sistema imune e interfere no metabolismo sistêmico. A primeira baseia-se na ativação do sistema imune via receptores da imunidade inata. Trabalhos recentes indicam que diferentes ácidos graxos que estão aumentados na corrente sanguínea de indivíduos obesos, como o palmitato, são capazes de se ligar a receptores como TLR-4 (do inglês *Toll-Like Receptor 4*) e receptores do tipo NOD (inflamassoma NLRP3) (56, 57), o que poderia, então, aumentar a ativação de células do sistema imune e, conseqüentemente, aumentar as respostas inflamatórias no indivíduo.

A segunda via, por sua vez, foca na secreção de citocinas, quimiocinas e adipocinas inflamatórias pelo tecido adiposo. Com a obesidade, sugere-se que o tecido adiposo seja estimulado por condições de hipóxia e hipertrofia celular, aumentando a expressão de quimiocinas e citocinas inflamatórias (58-60). Em reflexo a isto, células do sistema imune são ativadas e migram ao tecido adiposo, havendo aumento na atividade NFκB e produção de espécies reativas de oxigênio, iniciando uma cascata inflamatória crônica com efeitos sistêmicos (61-63). Em longo prazo, este dano inflamatório pode resultar no desenvolvimento de doenças crônicas associadas a distúrbios metabólicos e do sistema imune. Em paralelo, o tecido adiposo produz diversas moléculas bioativas de ação parácrina e sistêmica, denominadas adipocinas, descritas na literatura a mediar ações do tecido adiposo. Dentre elas estão leptina, resistina, visfatina e adiponectina. Na obesidade, o tecido adiposo produz grande quantidade de leptina, a qual tem efeitos inflamatórios mediando a ativação de monócitos, a fagocitose e a produção de citocinas de perfil T_H1 (64-67), e a produção reduzida de adiponectina, a qual demonstra papel oposto ao da leptina, possuindo ação antidiabética, antiaterosclerótica e antiinflamatória (67-69).

Por fim, a terceira via recentemente sugerida propõe que a inflamação crônica observada na obesidade é um reflexo do desbalanço da microbiota intestinal, referida como

disbiose. De fato, a microbiota residente vem sendo reconhecida por apresentar papel crucial no funcionamento do organismo, bem como na modulação de respostas imunes locais e distantes. Animais SPF (do inglês *Specific-Pathogen-Free*) apresentam 40% mais massa gorda que animais *germ-free* sob mesma dieta, mesmo quando alimentados com menos ração, além disso, a colonização de animais *germ-free* com a matéria fecal de camundongos SPF promove aumento da adiposidade, revelando a relação próxima entre obesidade e microbiota intestinal (70, 71).

A colonização de camundongos *germ-free* com a microbiota de animais obesos resulta em aumento significativo de peso nos animais, associada à maior adiposidade (72), o que sugere uma composição microbiana única em animais obesos que favorece o acúmulo de gordura e o sobrepeso. Em paralelo, a transferência de microbiota intestinal de indivíduos magros para pacientes obesos com síndrome metabólica é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina dos pacientes obesos (73). Além do efeito da microbiota sobre a composição corporal, mudanças no hábito alimentar de animais promove a abundância de diferentes filos microbianos (74, 75), sugerindo que a dieta também possa regular a composição corporal, aumentando a propensão ao sobrepeso.

Apesar da diversidade que existe entre a microbiota de diferentes indivíduos, muitos estudos associam a disbiose relacionada à obesidade (75, 76) com o aumento na proporção de Firmicutes em relação ao filo Bacteroidetes no intestino (72, 77). Além disso, em modelo animal de obesidade induzida por dieta essas mudanças vêm sendo associadas com a inflamação intestinal e o aumento na expressão da ciclooxygenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e TLR (78). Em acréscimo, também tem sido descrito que a obesidade está relacionada ao aumento na permeabilidade intestinal com expressão reduzida das moléculas de adesão, como as junções oclusivas, permitindo aumento na entrada de endotoxinas no organismo (78-80), induzindo, então, a ativação do sistema imune (81).

1.3 Microbiota

O conjunto de microrganismos que vive em simbiose com o hospedeiro é denominado microbiota. Embora seja formada por bactérias, arqueias, vírus, fungos e protozoários, a composição bacteriana é a mais estudada e bem caracterizada (82). Dos quase 100 trilhões

de bactérias que colonizam o corpo humano alguns bilhões se abrigam no trato gastrointestinal (83) e na pele (84). Em indivíduos saudáveis, os principais colonizadores pertencem aos filos Bacteroidetes e Firmicutes, embora outros como Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, entre outros, também estejam presentes, porém em menor grau (85). Um estudo avaliando a estabilidade da microbiota intestinal de adultos saudáveis revelou relativa estabilidade no indivíduo e entre familiares próximos ao longo do tempo, embora bastante variável entre indivíduos não aparentados (86). Essa variação na composição da microbiota pode decorrer de diversos fatores como diferenças genéticas, senescência, condição física, uso de antibióticos e dieta.

Embora os primeiros estudos identificando diferenças na composição microbiana de habitats diferentes e entre amostras de indivíduos saudáveis e doentes datem do século passado (87), por muito tempo o impacto dessas diferenças na homeostase do indivíduo era desconhecido. Somente nas últimas décadas foi demonstrado que a microbiota contribui para a nutrição e metabolismo do sistema gastrointestinal, neutralização de drogas e carcinógenos, desenvolvimento e regulação do sistema imune, efeito de barreira e proteção contra patógenos (88, 89). Sabe-se hoje que a microbiota intestinal desenvolve um papel essencial na fisiologia normal, sendo responsável por prevenir a colonização por microrganismos patogênicos, bem como pela quebra de carboidratos complexos e fibras em sacarídeos menores que podem ser, então, fermentados em componentes ativos como ácidos graxos de cadeia curta (como o acetato e o butirato) (90, 91).

A comunicação microbiota-hospedeiro é bidirecional, ou seja, alterações na microbiota influenciam na homeostase do hospedeiro e, por sua vez, alterações no organismo modificam a composição da microbiota. O polissacarídeo A presente no simbiote *Bacteroides fragilis*, por exemplo, é capaz de modular a maturação do sistema imune estabelecendo balanço adequado das respostas T_H1/T_H2 no hospedeiro (92). Em contrapartida, a liberação de noradrenalina em resposta ao estresse favorece o crescimento de bactérias gram negativas, em especial da *Escherichia coli* (93). Embora a microbiota seja fundamental para a manutenção da homeostase e saúde do hospedeiro, quando a barreira intestinal é alterada esses microrganismos podem contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias.

Alterações quantitativas e qualitativas da flora intestinal (94) têm sido descritas em diversas doenças, tais como colite, alergia, câncer, obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (95-100). Nesse contexto, trabalhos recentes também demonstram alteração na composição da microbiota em diferentes tipos de transplante.

1.4 Transplante, Obesidade e Microbiota

Alterações do sistema imunológico em associação ao aumento de peso dos receptores têm se tornado um importante desafio no transplante clínico. No entanto, há pouco consenso na literatura a respeito do impacto da obesidade na rejeição ao transplante. Diversos estudos têm demonstrado relação direta entre o IMC com a rejeição aguda de transplantes renais (101, 102). Confirmando estes achados, outros estudos também relacionam a obesidade com menor sobrevida de transplantes de coração (103) e pulmão em longo prazo (104). Além disso, o excesso de peso tem sido associado com aumento de complicações cirúrgicas e infecções (105). Por outro lado, diversos outros trabalhos falharam em confirmar esses dados, não observando correlação entre obesidade e rejeição ao enxerto (106-108).

A alteração da liberação de adipocinas por adipócitos de receptores obesos está bem estabelecida (109) e tem sido relacionada à modulação da rejeição alogênica em camundongos. Estudos com animais deficientes em adiponectina mostraram grave rejeição aguda de transplante cardíaco, quadro o qual foi revertido quando os animais foram providos desta adipocina, fornecendo uma nova visão da imunorregulação do transplante em relação à obesidade (110). Outro trabalho demonstrou que animais obesos deficientes em leptina, adipocina pró-inflamatória, exibiam aumento da sobrevida do enxerto por um mecanismo que envolvia o favorecimento de um perfil imunológico T_H2 e indução de células T reguladoras (111).

Apesar de diversos trabalhos terem se dedicado à análise da rejeição ao transplante em receptores obesos, ainda existe uma lacuna significativa na compreensão dos mecanismos envolvidos com a menor sobrevida do enxerto geralmente observada nesses indivíduos. Em modelo animal, dois trabalhos diferentes mostraram que a hiperlipidemia associada à obesidade promoveu rejeição acelerada de enxertos cardíacos pela inibição de células T reguladoras e estimulação da ativação de células T_H17 (112, 113). Além disso, outro trabalho

demonstrou que a obesidade induzida por dieta é capaz de alterar a composição e o fenótipo de células apresentadoras de antígenos e ao submeter esses animais ao transplante cardíaco observaram rejeição precoce em relação a animais magros (114).

Além dos pacientes transplantados apresentarem maior risco de infecção em relação à população geral, infecções patogênicas ativas podem influenciar no desfecho dos órgãos transplantados através do dano direto mediado pelo microrganismo ou indiretamente pela ativação da resposta aloimune. Infecções por *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* no momento do transplante podem aumentar a alorreatividade e prevenir a indução de tolerância ao transplante através do bloqueio de moléculas co-estimuladoras (115, 116). Nos últimos anos, tem sido sugerido que não somente sinais microbianos emitidos por patógenos estranhos ao indivíduo poderiam exercer papel na regulação da imunidade, mas também aqueles originados de microrganismos comensais componentes da microbiota endógena. Com isso, surgiu o interesse em estabelecer a contribuição entre a microbiota e o sistema imune na homeostase e na doença.

Em paralelo, o amplo uso de antibióticos e drogas imunossupressoras em pacientes transplantados pode ter consequências importantes na composição e diversidade de sua microbiota, a qual pode, por sua vez, promover alterações na resposta imune (117-119). Contudo, o efeito da microbiota no desfecho de transplantes começou a ser explorado somente recentemente, de modo que nossa compreensão a respeito dos mecanismos envolvidos nas interações microrganismo-hospedeiro ainda é bastante escassa. Trabalhos recentes em animais e humanos têm demonstrado alterações na composição da microbiota após transplante hematopoiético (120-122), renal (123, 124) e hepático (125, 126), além de ter sido identificada correlação entre o desfecho do transplante em pacientes com alterações pontuais na microbiota intestinal e do aloenxerto. No entanto, ainda não está claro se as alterações observadas são causa ou consequência da resposta imune alogênica, ou ainda se decorrem das diferentes abordagens clínicas utilizadas para manutenção da sobrevida do enxerto e do paciente. Uma possível associação causal foi ilustrada no modelo de transplante de medula óssea, no qual a comunicação entre a microbiota e células do sistema imune pôde ser identificada com a inflamação mudando o perfil da microbiota comensal, a qual, por sua vez, exacerbou a inflamação associada à doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD, do inglês *Graft versus Host Disease*) (122). Tal trabalho observou que a microbiota tem um importante efeito no GvHD, de modo que pacientes com redução na

diversidade global da microbiota apresentam piora na sobrevivência depois do transplante de medula óssea, além de correlacionar o estágio da doença à disbiose, particularmente com a expansão do filo Lactobacilos e diminuição de Clostridiales (122, 127).

Quanto ao transplante de órgão sólido, um trabalho recente caracterizou a influência da microbiota na ativação do sistema imune no transplante de pele alogênico, avaliando a progressão da rejeição ao aloenxerto em animais tratados ou não com antibióticos (128). Neste trabalho, os pesquisadores não somente identificaram alterações pontuais na microbiota intestinal e da pele dos receptores, mas também mostraram que a microbiota endógena de animais SPF e a sinalização de IFN tipo I promovem a rejeição de enxertos de pele. Este trabalho fornece a perspectiva de que a microbiota é um importante fator ambiental modulador do desenvolvimento e ativação de respostas alogênicas. Dessa forma, entender as implicações de condições que alteram a composição da microbiota endógena no contexto do transplante é de extrema importância.

Como a obesidade está associada com a disbiose, assim como aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia (80), é possível que mudanças na microbiota intestinal associada à obesidade possam contribuir para a rejeição ao transplante. Alguns trabalhos têm avaliado se a disbiose está associada com pior prognóstico no transplante de órgãos sólidos, mas a associação entre disbiose e desfecho do transplante somente foi observada na rejeição de aloenxertos de intestino delgado (129, 130). Ainda, no transplante de medula óssea, o aumento de *Enterococcus* foi associado com pior prognóstico do GvHD (121), indicando que mudanças precoces no microbioma intestinal podem afetar a inflamação no contexto do transplante de medula alogênico. Em paralelo, a depleção da microbiota intestinal em pacientes antes do transplante foi capaz de prevenir o aparecimento do GvHD agudo em uma coorte de crianças (131). Assim, a microbiota parece ter papel central no controle da inflamação relacionada com o transplante. Contudo, ainda se faz necessário avaliar se a disbiose desencadeada pela obesidade contribui para a rejeição ao transplante.

2. JUSTIFICATIVA

Segundo pesquisas demográficas, a obesidade tem se tornado uma epidemia expressiva nas últimas décadas. Juntamente, estudos têm evidenciado a correlação entre o excesso de tecido adiposo e processos inflamatórios sistêmicos influenciando a ocorrência de diversas comorbidades, como síndrome metabólica e irregularidades no sistema imune. Trabalhos recentes indicam que não somente a alteração na expressão de citocinas e adipocinas pelo tecido adiposo, mas também a disbiose intestinal induzida pela obesidade, podem regular a ativação imunológica sistêmica. Dessa forma, a microbiota torna-se um possível alvo para o estudo de terapias e patologias com alteração do sistema imune.

Embora o transplante de órgãos sólidos seja, atualmente, a única alternativa para certas doenças em estágio crônico terminais, o reconhecimento do tecido transplantado como estranho por células T alorreativas invariavelmente leva à rejeição do enxerto. Portanto, o estudo de possíveis moduladores do processo de rejeição é de vital importância na busca do aumento de sobrevida do enxerto e do paciente. Nesse sentido, a microbiota tem emergido como um potencial modulador de respostas aloimunes, já sendo possível estabelecer associação entre alguns filos bacterianos e o pior prognóstico de rejeição.

Em paralelo, trabalhos recentes indicam que a obesidade está associada à disbiose intestinal, a qual já foi observada por ter implicações em outras complicações imunes. Considerando a associação entre o processo inflamatório crônico e a disbiose associada à obesidade, com a modulação da ativação do sistema imune pela microbiota, nós buscamos nesse trabalho testar a hipótese de que a obesidade acelera a rejeição alogênica e que alterações na composição da microbiota decorrentes da obesidade levam a implicações diretas na sobrevida de transplantes ao facilitar a ativação de células T.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o impacto da obesidade induzida por dieta na rejeição ao transplante semi-alogênico de pele.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o modelo de obesidade induzida por dieta;
- Avaliar o impacto da obesidade na rejeição ao transplante de pele semi-alogênico;
- Caracterizar aspectos imunológicos da rejeição ao transplante;
- Caracterizar a composição da microbiota induzida pela dieta hiperlipídica; e
- Determinar o papel da microbiota associada à obesidade na rejeição ao transplante semi-alogênico.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- ✓ a administração de dieta hiperlipídica (60% kcal em lipídeos) por 12 semanas é eficaz em induzir quadro metabólico característico da obesidade;
- ✓ a obesidade induzida por dieta acelera a rejeição ao transplante de pele semi-alogênico, a qual foi associada ao aumento na resposta T_H17 ;
- ✓ a composição da microbiota intestinal é modulada pela dieta;
- ✓ a rejeição ao transplante no contexto da obesidade é, ao menos parcialmente, dependente da microbiota, visto que o tratamento com antibióticos reduz a resposta T_H17 e prolonga a sobrevida do enxerto;
- ✓ a composição da microbiota intestinal influencia na sobrevida do enxerto, uma vez que animais alimentados com dieta padrão após tratamento com antibióticos rejeitam o enxerto de pele mais rapidamente, e que a monocolonização com SFB, clássico indutor de células T_H17 no intestino delgado, acelera a rejeição alogênica.

5. ANEXOS

5.1. Parecer comissão de ética em experimentação animal

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Papel da microbiota intestinal relacionada à obesidade no transplante alogênico de pele experimental*", registrado sob o protocolo nº **75/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **20/06/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Niels Olsen Saraiva Camara**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Fernanda Fernandes Terra (Pós-graduando), Meire Ioshie Hiyane (Especialista de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*The role of obesity-related intestinal microbiota in experimental allogeneic skin transplantation*", protocol nº **75/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **6/20/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Niels Olsen Saraiva Camara**

- Team members: *Fernanda Fernandes Terra (Graduate Student), Meire Ioshie Hiyane (Laboratory Technician).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	F1 (Balb-c x C57bl/6)	Macho/male	8-10 semanas/weeks	48
	C57bl/6	Macho/male	4 semanas/weeks	222
	C57bl/6	Macho/male	8-10 semanas/weeks	30

São Paulo, 22 de junho de 2017.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Registro Brasileiro de Transplantes. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). 2019. p. 24.
2. Ireland R. Renal transplantation: Making kidneys count. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(6):311.
3. Baran DA. New directions in immunosuppression after heart transplantation. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(7):422-7.
4. Morris PJ. Transplantation--a medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2678-80.
5. Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol*. 1996;8(1):75-81.
6. Ko EJ, Yu JH, Yang CW, Chung BH, Group KOTRS. Clinical outcomes of ABO- and HLA-incompatible kidney transplantation: a nationwide cohort study. *Transpl Int*. 2017;30(12):1215-25.
7. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*. 1999;401(6756):921-3.
8. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens*. 2004;64(6):631-49.
9. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(10):702-9.
10. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:369-96.
11. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 1994;76(2):287-99.
12. Luz JG, Huang M, Garcia KC, Rudolph MG, Apostolopoulos V, Teyton L, et al. Structural comparison of allogeneic and syngeneic T cell receptor-peptide-major histocompatibility complex complexes: a buried alloreactive mutation subtly alters peptide presentation substantially increasing V(beta) Interactions. *J Exp Med*. 2002;195(9):1175-86.
13. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S324-35.
14. Doxiadis II, Smits JM, Schreuder GM, Persijn GG, van Houwelingen HC, van Rood JJ, et al. Association between specific HLA combinations and probability of kidney allograft loss: the taboo concept. *Lancet*. 1996;348(9031):850-3.
15. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens*. 1999;53(4 Pt 2):407-46.
16. Zachary AA, Hart JM, Lucas DP, Leffell MS. The cost of mismatching. *Clin Transpl*. 2007;261-9.
17. Zachary AA, Leffell MS. HLA Mismatching Strategies for Solid Organ Transplantation - A Balancing Act. *Front Immunol*. 2016;7:575.
18. Williams RC, Opelz G, McGarvey CJ, Weil EJ, Chakkeri HA. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation*. 2016;100(5):1094-102.
19. Cheigh JS, Chami J, Stenzel KH, Riggio RR, Saal S, Mouradian JA, et al. Renal transplantation between HLA identical siblings. Comparison with transplants from HLA semi-identical related donors. *N Engl J Med*. 1977;296(18):1030-4.
20. Ascher NL, Simmons RL, Noreen H, VanHook J, Howard RJ, Sutherland DE, et al. 100 HLA-identical sibling transplants. Prognostic factors other than histocompatibility. *Ann Surg*. 1979;189(2):209-16.
21. Held PJ, Kahan BD, Hunsicker LG, Liska D, Wolfe RA, Port FK, et al. The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants. *N Engl J Med*. 1994;331(12):765-70.
22. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol*. 2002;10(2-3):101-8.
23. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*. 2007;69(6):545-56.

24. Shoskes DA, Wood KJ. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today*. 1994;15(1):32-8.
25. Auchincloss H, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3373-7.
26. Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, et al. Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11796-801.
27. Wülfing C, Sumen C, Sjaastad MD, Wu LC, Dustin ML, Davis MM. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat Immunol*. 2002;3(1):42-7.
28. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*. 2010;238(1):247-62.
29. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:411-33.
30. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*. 1966;2(7465):662-5.
31. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(10):807-17.
32. Tait BD. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front Immunol*. 2016;7:570.
33. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111-9.
34. Cancello R, Clément K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*. 2006;113(10):1141-7.
35. Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27 Suppl 3:S25-8.
36. Bouloumié A, Curat CA, Sengenès C, Lolmède K, Miranville A, Busse R. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005;8(4):347-54.
37. Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(4):319-26.
38. Tse GH, Hesketh EE, Clay M, Borthwick G, Hughes J, Marson LP. Mouse kidney transplantation: models of allograft rejection. *J Vis Exp*. 2014(92):e52163.
39. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nat Med*. 2005;11(6):605-13.
40. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med*. 1990;172(5):1483-93.
41. Matsuo S, Kurisaki A, Sugino H, Hashimoto I, Nakanishi H. Analysis of skin graft survival using green fluorescent protein transgenic mice. *J Med Invest*. 2007;54(3-4):267-75.
42. Organization. WH. Global Health Observatory (GHO) Data - Overweight and obesity. https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/2016 [
43. James WP. WHO recognition of the global obesity epidemic. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32 Suppl 7:S120-6.
44. Stępień M, Stępień A, Wlazeł RN, Paradowski M, Banach M, Rysz J. Obesity indices and inflammatory markers in obese non-diabetic normo- and hypertensive patients: a comparative pilot study. *Lipids Health Dis*. 2014;13:29.
45. Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:678159.
46. Han JM, Levings MK. Immune regulation in obesity-associated adipose inflammation. *J Immunol*. 2013;191(2):527-32.
47. Anjos LAd. *Obesidade e Saúde Pública*. 20 ed. Editora Fiocruz 2006. 100 p.

48. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2094-101.
49. Neels JG, Olefsky JM. Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest.* 2006;116(1):33-5.
50. Lolmède K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(10):1187-95.
51. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 2007;56(4):901-11.
52. Wood IS, de Heredia FP, Wang B, Trayhurn P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc.* 2009;68(4):370-7.
53. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-61.
54. Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci Rep.* 2012;2:799.
55. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med.* 2012;18(1):59-68.
56. Reynolds CM, McGillicuddy FC, Harford KA, Finucane OM, Mills KH, Roche HM. Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(8):1212-22.
57. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:52.
58. Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):81.
59. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(6):399-409.
60. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-808.
61. Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogdon JG, Pan L, Sherry B, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med.* 2012;42(6):563-70.
62. Lê KA, Mahurkar S, Alderete TL, Hasson RE, Adam TC, Kim JS, et al. Subcutaneous adipose tissue macrophage infiltration is associated with hepatic and visceral fat deposition, hyperinsulinemia, and stimulation of NF- κ B stress pathway. *Diabetes.* 2011;60(11):2802-9.
63. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation.* 2004;110(12):1564-71.
64. Gigante DP, de França GV, Sardinha LM, Iser BP, Meléndez GV. Temporal variation in the prevalence of weight and obesity excess in adults: Brazil, 2006 to 2009. *Rev Bras Epidemiol.* 2011;14 Suppl 1:157-65.
65. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* 1998;394(6696):897-901.
66. Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW, Huffnagle GB. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *J Immunol.* 2002;168(8):4018-24.
67. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97.
68. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004;92(3):347-55.
69. Leu HB, Chung CM, Lin SJ, Jong YS, Pan WH, Chen JW. Adiponectin gene polymorphism is selectively associated with the concomitant presence of metabolic syndrome and essential hypertension. *PLoS One.* 2011;6(5):e19999.

70. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-23.
71. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):979-84.
72. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
73. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012;143(4):913-6.e7.
74. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007;50(11):2374-83.
75. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
76. Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Bergé M, Cenac C, et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*. 2012;61(4):543-53.
77. Kallus SJ, Brandt LJ. The intestinal microbiota and obesity. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(1):16-24.
78. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7(10):e47713.
79. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palù G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(2):G518-25.
80. 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 Metab*. 2015;21(4):527-42.
81. Duca FA, Sakar Y, Lepage P, Devime F, Langelier B, Doré J, et al. Replication of obesity and associated signaling pathways through transfer of microbiota from obese-prone rats. *Diabetes*. 2014;63(5):1624-36.
82. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3(4):213-23.
83. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8.
84. Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*. 2014;346(6212):954-9.
85. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
86. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 2013;341(6141):1237439.
87. Dobell C. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proc R Soc Med*. 1920;13(Sect Hist Med):1-15.
88. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915-20.
89. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:283-307.
90. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-803.
91. Kho ZY, Lal SK. The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Front Microbiol*. 2018;9:1835.
92. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005;122(1):107-18.
93. Lyte M, Bailey MT. Neuroendocrine-bacterial interactions in a neurotoxin-induced model of trauma. *J Surg Res*. 1997;70(2):195-201.

94. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998;41(2):85-101.
95. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(34):13780-5.
96. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, Willing BP, Thorson L, Wlodarska M, et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* 2012;13(5):440-7.
97. Sobhani I, Amiot A, Le Baleur Y, Levy M, Auriault ML, Van Nhieu JT, et al. Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease? *Therap Adv Gastroenterol.* 2013;6(3):215-29.
98. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes.* 2010;59(12):3049-57.
99. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490(7418):55-60.
100. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63.
101. Gore JL, Pham PT, Danovitch GM, Wilkinson AH, Rosenthal JT, Lipshutz GS, et al. Obesity and outcome following renal transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6(2):357-63.
102. Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft failure and patient death. *Transplantation.* 2002;73(1):70-4.
103. Russo MJ, Hong KN, Davies RR, Chen JM, Mancini DM, Oz MC, et al. The effect of body mass index on survival following heart transplantation: do outcomes support consensus guidelines? *Ann Surg.* 2010;251(1):144-52.
104. Lederer DJ, Wilt JS, D'Ovidio F, Bacchetta MD, Shah L, Ravichandran S, et al. Obesity and underweight are associated with an increased risk of death after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(9):887-95.
105. Schaeffer DF, Yoshida EM, Buczkowski AK, Chung SW, Steinbrecher UP, Erb SE, et al. Surgical morbidity in severely obese liver transplant recipients - a single Canadian Centre Experience. *Ann Hepatol.* 2009;8(1):38-40.
106. Drafts HH, Anjum MR, Wynn JJ, Mulloy LL, Bowley JN, Humphries AL. The impact of pre-transplant obesity on renal transplant outcomes. *Clin Transplant.* 1997;11(5 Pt 2):493-6.
107. Massarweh NN, Clayton JL, Mangum CA, Florman SS, Slakey DP. High body mass index and short- and long-term renal allograft survival in adults. *Transplantation.* 2005;80(10):1430-4.
108. LaMattina JC, Foley DP, Fernandez LA, Pirsch JD, Musat AI, D'Alessandro AM, et al. Complications associated with liver transplantation in the obese recipient. *Clin Transplant.* 2012;26(6):910-8.
109. Małgorzewicz S, Dębska-Slizień A, Czajka B, Rutkowski B. Adipokines and nutritional status in kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2014;46(8):2622-6.
110. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 1999;341(15):1097-105.
111. Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med.* 2002;162(16):1867-72.
112. Yuan J, Bagley J, Iacomini J. Hyperlipidemia Promotes Anti-Donor Th17 Responses That Accelerate Allograft Rejection. *Am J Transplant.* 2015;15(9):2336-45.
113. Bagley J, Yuan J, Chandrakar A, Iacomini J. Hyperlipidemia Alters Regulatory T Cell Function and Promotes Resistance to Tolerance Induction Through Costimulatory Molecule Blockade. *Am J Transplant.* 2015;15(9):2324-35.
114. Molinero LL, Yin D, Lei YM, Chen L, Wang Y, Chong AS, et al. High-Fat Diet-Induced Obesity Enhances Allograft Rejection. *Transplantation.* 2016;100(5):1015-21.

115. Ahmed EB, Wang T, Daniels M, Alegre ML, Chong AS. IL-6 induced by *Staphylococcus aureus* infection prevents the induction of skin allograft acceptance in mice. *Am J Transplant.* 2011;11(5):936-46.
116. Wang T, Ahmed EB, Chen L, Xu J, Tao J, Wang CR, et al. Infection with the intracellular bacterium, *Listeria monocytogenes*, overrides established tolerance in a mouse cardiac allograft model. *Am J Transplant.* 2010;10(7):1524-33.
117. Nellore A, Fishman JA. The Microbiome, Systemic Immune Function, and Allotransplantation. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(1):191-9.
118. Zaza G, Dalla Gassa A, Felis G, Granata S, Torriani S, Lupo A. Impact of maintenance immunosuppressive therapy on the fecal microbiome of renal transplant recipients: Comparison between an everolimus- and a standard tacrolimus-based regimen. *PLoS One.* 2017;12(5):e0178228.
119. Rey K, Manku S, Enns W, Van Rossum T, Bushell K, Morin RD, et al. Disruption of the Gut Microbiota With Antibiotics Exacerbates Acute Vascular Rejection. *Transplantation.* 2018;102(7):1085-95.
120. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2012;55(7):905-14.
121. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsruker C, Koestler J, Peter K, et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(5):640-5.
122. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2012;209(5):903-11.
123. Lee JR, Muthukumar T, Dadhania D, Toussaint NC, Ling L, Pamer E, et al. Gut microbial community structure and complications after kidney transplantation: a pilot study. *Transplantation.* 2014;98(7):697-705.
124. Fricke WF, Maddox C, Song Y, Bromberg JS. Human microbiota characterization in the course of renal transplantation. *Am J Transplant.* 2014;14(2):416-27.
125. Yu MH, Yu XL, Chen CL, Gao LH, Mao WL, Yan D, et al. [The change of intestinal microecology in rats after orthotopic liver transplantation]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2008;46(15):1139-42.
126. Xie YR, Liu SL, Liu X, Luo ZB, Zhu B, Li ZF, et al. Intestinal microbiota and innate immunity-related gene alteration in cirrhotic rats with liver transplantation. *Transplant Proc.* 2011;43(10):3973-9.
127. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2014;124(7):1174-82.
128. Lei YM, Chen L, Wang Y, Stefka AT, Molinero LL, Theriault B, et al. The composition of the microbiota modulates allograft rejection. *J Clin Invest.* 2016;126(7):2736-44.
129. Oh PL, Martínez I, Sun Y, Walter J, Peterson DA, Mercer DF. Characterization of the ileal microbiota in rejecting and nonrejecting recipients of small bowel transplants. *Am J Transplant.* 2012;12(3):753-62.
130. Alegre ML, Mannon RB, Mannon PJ. The microbiota, the immune system and the allograft. *Am J Transplant.* 2014;14(6):1236-48.
131. Vossen JM, Guiot HF, Lankester AC, Vossen AC, Bredius RG, Wolterbeek R, et al. Complete suppression of the gut microbiome prevents acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *PLoS One.* 2014;9(9):e105706.
132. de Sá RD, Crisma AR, Cruz MM, Martins AR, Masi LN, do Amaral CL, et al. Fish oil prevents changes induced by a high-fat diet on metabolism and adipokine secretion in mice subcutaneous and visceral adipocytes. *J Physiol.* 2016;594(21):6301-17.
133. Lusk G. Animal calorimetry: twenty-fourth paper. Analysis of the oxidation of mixtures of carbohydrate and

fat. *J. Biol. Chem.* 1924 p. 41-2.

134. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
135. Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol*. 2001;167(2):741-8.
136. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*. 2007;19(2):59-69.
137. Ivanov II, Frutos ReL, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*. 2008;4(4):337-49.
138. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139(3):485-98.
139. Papalia T, Greco R, Lofaro D, Maestripieri S, Mancuso D, Bonofiglio R. Impact of body mass index on graft loss in normal and overweight patients: retrospective analysis of 206 renal transplants. *Clin Transplant*. 2010;24(6):E241-6.
140. Sampaio MS, Reddy PN, Kuo HT, Poommipanit N, Cho YW, Shah T, et al. Obesity was associated with inferior outcomes in simultaneous pancreas kidney transplant. *Transplantation*. 2010;89(9):1117-25.
141. Meier-Kriesche HU, Vaghela M, Thambuganipalle R, Friedman G, Jacobs M, Kaplan B. The effect of body mass index on long-term renal allograft survival. *Transplantation*. 1999;68(9):1294-7.
142. Grady KL, White-Williams C, Naftel D, Costanzo MR, Pitts D, Rayburn B, et al. Are preoperative obesity and cachexia risk factors for post heart transplant morbidity and mortality: a multi-institutional study of preoperative weight-height indices. Cardiac Transplant Research Database (CTRD) Group. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18(8):750-63.
143. Grady KL, Costanzo MR, Fisher S, Koch D. Preoperative obesity is associated with decreased survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1996;15(9):863-71.
144. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-30.
145. Lee IS, Shin G, Choue R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. *Endocr J*. 2010;57(1):39-50.
146. Fenton JI, Nuñez NP, Yakar S, Perkins SN, Hord NG, Hursting SD. Diet-induced adiposity alters the serum profile of inflammation in C57BL/6N mice as measured by antibody array. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11(4):343-54.
147. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav*. 2004;81(2):243-8.
148. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10(2):131-45.
149. Moraes-Vieira PM, Bassi EJ, Larocca RA, Castoldi A, Burghos M, Lepique AP, et al. Leptin deficiency modulates allograft survival by favoring a Th2 and a regulatory immune profile. [corrected]. *Am J Transplant*. 2013;13(1):36-44.
150. Iikuni N, Lam QL, Lu L, Matarese G, La Cava A. Leptin and Inflammation. *Curr Immunol Rev*. 2008;4(2):70-9.
151. Lopes HF, Corrêa-Giannella ML, Consolim-Colombo FM, Egan BM. Visceral adiposity syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8:40.
152. Kwon H, Kim D, Kim JS. Body Fat Distribution and the Risk of Incident Metabolic Syndrome: A Longitudinal Cohort Study. *Sci Rep*. 2017;7(1):10955.
153. Kovesdy CP, Czira ME, Rudas A, Ujszaszi A, Rosivall L, Novak M, et al. Body mass index, waist circumference and mortality in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2010;10(12):2644-51.
154. Pham PT, Danovitch GM, Pham PC. Obesity and its impact on transplantation and alloimmunity. *Transplantation*. 2013;96(10):e71-2.

155. Quante M, Dietrich A, ElKhal A, Tullius SG. Obesity-related immune responses and their impact on surgical outcomes. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(6):877-83.
156. Udgiri NR, Kashyap R, Minz M. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft failure and patient death. *Transplantation*. 2003;75(2):249.
157. Dander E, Balduzzi A, Zappa G, Lucchini G, Perseghin P, Andr V, et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2009;88(11):1261-72.
158. Chen L, Ahmed E, Wang T, Wang Y, Ochando J, Chong AS, et al. TLR signals promote IL-6/IL-17-dependent transplant rejection. *J Immunol*. 2009;182(10):6217-25.
159. Vokaer B, Van Rompaey N, Lematre PH, Lhomm F, Kubjak C, Benghiat FS, et al. Critical role of regulatory T cells in Th17-mediated minor antigen-disparate rejection. *J Immunol*. 2010;185(6):3417-25.
160. Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, D'Addio F, Mfarrej B, Donnarumma M, et al. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J Exp Med*. 2008;205(13):3133-44.
161. Chadha R, Heidt S, Jones ND, Wood KJ. Th17: contributors to allograft rejection and a barrier to the induction of transplantation tolerance? *Transplantation*. 2011;91(9):939-45.
162. Abadja F, Sarraj B, Ansari MJ. Significance of T helper 17 immunity in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012;17(1):8-14.
163. Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, Winer D, et al. Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol*. 2009;39(9):2629-35.
164. Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res*. 2008;103(5):467-76.
165. Strissel KJ, DeFuria J, Shaul ME, Bennett G, Greenberg AS, Obin MS. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(10):1918-25.
166. D'Elis MM, Josien R, Manghetti M, Amedei A, de Carli M, Cuturi MC, et al. Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney Int*. 1997;51(6):1876-84.
167. Zelenika D, Adams E, Mellor A, Simpson E, Chandler P, Stockinger B, et al. Rejection of H-Y disparate skin grafts by monospecific CD4+ Th1 and Th2 cells: no requirement for CD8+ T cells or B cells. *J Immunol*. 1998;161(4):1868-74.
168. Mori DN, Kreisel D, Fullerton JN, Gilroy DW, Goldstein DR. Inflammatory triggers of acute rejection of organ allografts. *Immunol Rev*. 2014;258(1):132-44.
169. Zheng HL, Shi BY, Du GS, Wang Z. Changes in Th17 and IL-17 levels during acute rejection after mouse skin transplantation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(18):2720-86.
170. Li X, Tang XH, Tang LL, Yu HB, Xie ZG, Zhou ZG. Changes of Regulatory T Cells in the Early Stage of Obesity Mice and Their Modulation on Macrophage Subtypes in Visceral Adipose Tissue. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2016;38(4):399-403.
171. Wagner NM, Brandhorst G, Czepluch F, Lankeit M, Eberle C, Herzberg S, et al. Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(3):461-8.
172. Chung BH, Oh HJ, Piao SG, Sun IO, Kang SH, Choi SR, et al. Higher infiltration by Th17 cells compared with regulatory T cells is associated with severe acute T-cell-mediated graft rejection. *Exp Mol Med*. 2011;43(11):630-7.
173. Mirsoian A, Bouchlaka MN, Sckisel GD, Chen M, Pai CC, Maverakis E, et al. Adiposity induces lethal cytokine storm after systemic administration of stimulatory immunotherapy regimens in aged mice. *J Exp Med*. 2014;211(12):2373-83.
174. Hanidziar D, Koulmanda M. Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(4):411-5.

175. Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, et al. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37041-51.
176. Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, Lemay DG, Youn HS, Hwang DH. Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol*. 2005;174(9):5390-7.
177. Ramirez O, Garza KM. Leptin deficiency in vivo enhances the ability of splenic dendritic cells to activate T cells. *Int Immunol*. 2014;26(11):627-36.
178. Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol*. 2005;174(11):6820-8.
179. Mattioli B, Straface E, Matarrese P, Quaranta MG, Giordani L, Malorni W, et al. Leptin as an immunological adjuvant: enhanced migratory and CD8+ T cell stimulatory capacity of human dendritic cells exposed to leptin. *FASEB J*. 2008;22(6):2012-22.
180. Reis BS, Lee K, Fanok MH, Mascaraque C, Amoury M, Cohn LB, et al. Leptin receptor signaling in T cells is required for Th17 differentiation. *J Immunol*. 2015;194(11):5253-60.
181. Gerriets VA, Danzaki K, Kishton RJ, Eisner W, Nichols AG, Saucillo DC, et al. Leptin directly promotes T-cell glycolytic metabolism to drive effector T-cell differentiation in a mouse model of autoimmunity. *Eur J Immunol*. 2016;46(8):1970-83.
182. Haluzík M, Fiedler J, Nedvídková J, Ceska R. Serum leptin levels in patients with hyperlipidemias. *Nutrition*. 2000;16(6):429-33.
183. Hand TW, Dos Santos LM, Bouladoux N, Molloy MJ, Pagán AJ, Pepper M, et al. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. *Science*. 2012;337(6101):1553-6.
184. Uchimura Y, Wyss M, Brugiroux S, Limenitakis JP, Stecher B, McCoy KD, et al. Complete Genome Sequences of 12 Species of Stable Defined Moderately Diverse Mouse Microbiota 2. *Genome Announc*. 2016;4(5).
185. Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, Geuking MB, Lawson MA, Wyss M, et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun*. 2015;6:8292.
186. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(5):1286-92.
187. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010;328(5975):228-31.
188. Denou E, Lolmède K, Garidou L, Pomie C, Chabo C, Lau TC, et al. Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance. *EMBO Mol Med*. 2015;7(3):259-74.
189. Nevado R, Forcén R, Layunta E, Murillo MD, Grasa L. Neomycin and bacitracin reduce the intestinal permeability in mice and increase the expression of some tight-junction proteins. *Rev Esp Enferm Dig*. 2015;107(11):672-6.
190. Tulstrup MV, Christensen EG, Carvalho V, Linnings C, Ahrné S, Højberg O, et al. Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144854.
191. Fujisaka S, Ussar S, Clish C, Devkota S, Dreyfuss JM, Sakaguchi M, et al. Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. *J Clin Invest*. 2016;126(12):4430-43.
192. Brandsma E, Houben T, Fu J, Shiri-Sverdlov R, Hofker MH. The immunity-diet-microbiota axis in the development of metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26(2):73-81.
193. Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(9):639-47.
194. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
195. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4.

196. Monk JM, Hou TY, Turk HF, Weeks B, Wu C, McMurray DN, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) decrease obesity-associated Th17 cell-mediated inflammation during colitis. *PLoS One*. 2012;7(11):e49739.
197. Gagliani N, Amezcua Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. 2015;523(7559):221-5.
198. Cosorich I, Dalla-Costa G, Sorini C, Ferrarese R, Messina MJ, Dolpady J, et al. High frequency of intestinal T. *Sci Adv*. 2017;3(7):e1700492.
199. Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, Molloy MJ, Salcedo R, Kastenmuller W, et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*. 2012;337(6098):1115-9.
200. McIntosh CM, Chen L, Shaiber A, Eren AM, Alegre ML. Gut microbes contribute to variation in solid organ transplant outcomes in mice. *Microbiome*. 2018;6(1):96.