

ANGELA CASTOLDI

**MyD88: UM MODULADOR DO PERFIL
INFLAMATÓRIO E METABÓLICO
NA OBESIDADE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

Castoldi A. MyD88: um modulador do perfil inflamatório e metabólico na obesidade experimental [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: Nos últimos anos, a ativação de receptores da imunidade inata nas células do sistema imune e no tecido adiposo foi descrita como crucial durante o desenvolvimento da obesidade. Além disso, alterações na microbiota intestinal foram relacionadas aos fenótipos inflamatórios e metabólicos na obesidade através do aumento da permeabilidade intestinal, com elevação dos níveis sistêmicos de endotoxina, que colabora para o aumento da inflamação e o desenvolvimento da resistência à insulina. A complexidade do sistema imune nos permite explorar essas vias de sinalização nos diversos órgãos, tecidos e células. Por isso formulamos a hipótese de que MyD88 regularia o desenvolvimento da obesidade, desempenhando um papel importante no tecido adiposo contribuindo para a resistência à insulina. Nos macrófagos, a sinalização via MyD88 favoreceria um perfil pró-inflamatório, e ainda, regularia alterações na microbiota intestinal que por sua vez estariam contribuindo nesse processo através de alterações na permeabilidade intestinal. **Objetivo:** Estudar a relação entre a obesidade e inflamação, focando no papel da molécula adaptadora MyD88 e sua importância no tecido adiposo, macrófagos, intestino e na modulação da microbiota intestinal. **Métodos:** Utilizamos camundongos C57BL/6, deficientes de MyD88 (KO), *Adiponectina^{cre}+MyD88^{flox +/+}* e *Lisozima^{cre}+MyD88^{flox +/+}* alimentados com dieta hiperlipídica e avaliamos os perfis metabólicos e inflamatórios, permeabilidade intestinal e alterações na microbiota intestinal. Ainda em um modelo de transplante de microbiota estudamos o possível papel da microbiota no desenvolvimento da obesidade. **Resultados:** Verificamos que camundongos MyD88 KO ganharam mais peso comparados aos camundongos WT, são mais intolerantes à glicose e resistentes à insulina. Porém, ao analisarmos o perfil inflamatório no tecido adiposo e sistêmico, observamos significativa diminuição de IL-1 β , TNF- α e IL-6 bem como diminuição na fosforilação das vias de sinalização pró-inflamatórias nos camundongos MyD88 KO obesos. No tecido adiposo, há um predomínio de macrófagos de perfil M1. Além disso, observamos menor inflamação no intestino, porém, a permeabilidade intestinal estava aumentada. A microbiota dos camundongos MyD88 KO foi capaz de induzir resistência à insulina nos camundongos WT, aumentou a permeabilidade intestinal e inflamação no tecido adiposo. A depleção de MyD88 no tecido adiposo não alterou o perfil metabólico dos camundongos comparados aos controles. No entanto, a depleção de MyD88 nos macrófagos, protegeu os camundongos do ganho de peso, resistência à insulina e do aumento da permeabilidade intestinal. Observamos maior polarização M2 no tecido adiposo desses camundongos. Ainda, camundongos MyD88 KO obesos não foram capazes de montar uma resposta inflamatória em resposta à sepse. No entanto, no tecido adiposo dos camundongos MyD88 KO obesos, observamos um aumento significativo da expressão de Dectina-1 e IFN- β , o que poderia explicar a resistência à insulina com a ausência da inflamação clássica. **Conclusão:** MyD88 desempenha um papel importante no desenvolvimento da obesidade modulando a microbiota e o perfil inflamatório.

Palavras-chave: MyD88. Obesidade. Resistência à insulina. Inflamação. Microbiota. Macrófagos. Tecido adiposo.

ABSTRACT

Castoldi A. MyD88: a modulator of inflammatory and metabolic profile in experimental obesity [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Background: Recently, activation of innate immune receptors in immune cells and adipose tissue has been described as crucial for the development of obesity. In addition, changes in intestinal microbiota have been related to inflammation in obesity and metabolic syndrome by increasing intestinal permeability, with increased systemic levels of endotoxin, which contributes to increases inflammation and development of insulin resistance. The complexity of the immune system allows us to explore these signaling pathways in different organs, tissues and cells. Therefore we hypothesized that MyD88 regulate the development of obesity and plays an important role in the adipose tissue contributing to insulin resistance. In addition, activation of MyD88 signaling pathway in macrophages would instigate a pro-inflammatory profile, and further, MyD88 would regulate changes in the intestinal microbiota which in turn may contribute to this process through changes in intestinal permeability. **Objective:** To study the relationship between obesity and inflammation, focusing on the role of the adapter molecule MyD88 and its importance in adipose tissue, macrophages, intestine and modulation of intestinal microbiota. **Methods:** We used C57BL/6, MyD88 (KO), Adiponectina^{cre+} MyD88^{flox^{+/+}} and Lisozima^{cre+} MyD88^{flox^{+/+}} high fat diet-fed mice and evaluate the metabolic and inflammatory profiles, intestinal permeability and changes in intestinal microbiota. In addition, we performed a microbiota transplantation model to study the role of the microbiota on obesity development. **Results:** We observed an increased weight gain in MyD88 KO mice compared to WT mice, they are glucose intolerant and insulin resistant. However, we observed a significant decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IL-6 as well as decrease the phosphorylation of pro-inflammatory signaling pathways in the adipose tissue and serum of MyD88 KO obese mice. In adipose tissue, there is a predominance of M1 macrophages. Furthermore, we observed less inflammation in the gut, however, intestinal permeability was increased. The microbiota of MyD88 KO mice was able to induce insulin resistance in WT mice, increased intestinal permeability and inflammation in adipose tissue. Depletion of MyD88 in adipose tissue did not change the metabolic profile of mice compared to controls. However, depletion of MyD88 in macrophages, protected mice from weight gain and insulin resistance, as well the intestinal permeability and increased M2 polarization in the adipose tissue. Furthermore, MyD88 KO obese mice were not able to mount an inflammatory response in response to sepsis. However, in the adipose tissue of obese MyD88 KO mice, we observed a significant increase in Dectin-1 and IFN- β expression, which could explain the insulin resistance without classical inflammation. **Conclusion:** MyD88 plays an important role in the development of obesity and microbiota modulating the inflammatory profile.

Keywords: MyD88. Obesity. Insulin resistance. Inflammation. Microbiota. Macrophages. Adipose tissue.

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA DE RECEPTORES TOLL-LIKE E A MOLÉCULA ADAPTADORA MyD88

Os receptores similares ao Toll (TLR) fazem parte de uma família de receptores transmembrânicos evolutivamente conservados caracterizados por um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio intracelular Toll/IL-1R (TIR- *Toll-interleukin-1 receptor*) devido a sua semelhança com os receptores da interleucina (IL)-1 (1), sendo expressos por células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos B e T, *natural killers* (NK) e por células parenquimatosas, epiteliais e endoteliais (2).

Existem no mínimo, quinze diferentes TLR em mamíferos, dos quais quase todos têm funções definidas nos seres humanos (3). Os TLR são divididos em duas categorias de grupos de receptores de membrana. Os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12 e TLR13 são encontrados na membrana da superfície celular e os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são encontrados nas membranas endossômicas. O TLR15, o mais recentemente descoberto, foi associado ao reconhecimento de componentes da salmonela (4, 5).

Quando ativados, os TLR desencadeiam sinalização intracelular que culmina com a síntese de compostos que podem eliminar o patógeno que ocorre pela ativação do fator de transcrição NF- κ B ou pelo fator de transcrição AP-1. Ambos são responsáveis pela transcrição de citocinas e quimiocinas. A ativação final do NF- κ B pode ser desencadeada por um sinal proveniente de um TLR e a via de sinalização pode ser dependente ou independente de MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene* (88)). A sinalização dependente de MyD88 é compartilhada por todos os TLR, exceto o TLR3. Se a via de ativação for independente de MyD88, o sinal proveniente dos TLR ativa NF- κ B através de outras duas moléculas adaptadoras, o TRIF (*domain-containing adapter inducing interferon β*) e o TRAM (*TRIF-related*

adapter molecule) (4, 6). Ainda, o MyD88 pode se associar ao TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein*), que é outra proteína adaptadora, para induzir a ativação de NF-κB. A via TRIF também pode atuar via outros fatores de transcrição além do NF-κB, como os membros da família IRF (*interferon regulatory factor*), nomeados IRF3, 5 e 7, levando a produção de interferon tipo I (IFN-β e IFN-α) (7, 8).

O TLR4 humano foi o primeiro TLR caracterizado em mamíferos (1). O TLR4 funciona como um receptor de transdução de sinal classicamente descrito para LPS, o que foi confirmado em camundongos C3H/HeJ deficientes na sinalização pelo TLR4, os quais não apresentavam respostas ao estímulo por LPS (1). O reconhecimento do LPS pelo TLR4 é complexo, e requer várias moléculas acessórias (9). A resposta inflamatória ao LPS é induzida juntamente com outras proteínas que se ligam a endotoxina como *LPS-binding* (LPB), CD14 e MD-2 (10). O reconhecimento inicia com a ligação de LBP no LPS e termina com a formação do complexo TLR4-MD2-LPS mediando a rápida produção de citocinas e o recrutamento de células para o foco inflamatório (10). Embora LPS seja o ligante mais estudado, o CD14 do complexo pode interagir com outras moléculas como ácido lipoteicóico (1) e ainda, com as citolisinas de bactérias gram-positivas (11) e dipeptídeos de micobactérias (12).

Por outro lado o TLR2 é responsável pelo reconhecimento de vários produtos microbianos, incluindo peptidoglicanos e lipoproteínas bacterianas, paredes celulares de fungos, dentre outros (13). O TLR2 pode exercer sua ação juntamente com outros dois receptores o TLR1 e TLR6. Apesar disso, estes dois últimos são expressos em vários tipos celulares, enquanto que a expressão do TLR2 parece ser restrita a células apresentadoras de antígeno e células endoteliais. Segundo Shishido et al., a ativação de TLR2 tem papel central na regulação da inflamação vascular em

camundongos, sugerindo que o TLR2 induz aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , e IL-6) e de espécies reativas de oxigênio (14).

Além da função dos TLRs na inflamação, essas moléculas têm um papel na indução de células T reguladoras. A sinalização via TLR4 dependente de MyD88 influencia a geração e expansão de células T reguladoras e não a sinalização via TRIF em resposta ao LPS (15). Em adição, a ativação de TLR2 foi correlacionada com uma redução da função das células T reguladoras na Esclerose Múltipla. Os autores mostraram que células T reguladoras de pacientes com Esclerose Múltipla expressavam altos níveis de TLR2 (16). No entanto, a expressão de TLR2 promove a sobrevivência das células T reguladoras (17). Similarmente, flagelina, um ligante de TLR5, aumenta a função supressora e a expressão de FOXP3 pelas células T reguladoras humanas, porém não induz a proliferação das mesmas (18).

Em adição aos TLRs, outros receptores transmembrânicos são dependentes da sinalização via MyD88 nas células do sistema imune: IL-1R e IL-18R. Tais moléculas desempenham um importante papel nas respostas imunes inatas e adquiridas e são receptores para IL-1 β /IL-1 α e IL-18, respectivamente. Além de MyD88, esses receptores podem recrutar outras moléculas adaptadoras similarmente aos TLRs, tais como IRAK, e TRAF as quais levarão a ativação de JNK, p38, NF- κ B e AP-1 (19).

De maneira importante, nos últimos anos todos esses receptores foram descritos como cruciais durante o desenvolvimento da obesidade (20, 21).

1.2 OBESIDADE

A obesidade pode ser descrita como a "Nova Síndrome Mundial", sendo uma condição complexa, afetando indivíduos de todas as idades e grupos socioeconômicos (22). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, no mundo,

atualmente 39% dos adultos acima de 18 anos apresentam sobrepeso e 13% são clinicamente obesos, em números mais exatos, aproximadamente 2 bilhões de adultos no mundo estão com sobrepeso sendo que, mais de meio bilhão são obesos (23).

A morbidade associada inclui, por exemplo, diabetes tipo II, dislipidemias, hipertensão, doença coronariana, entre outras. Além disso, a obesidade é caracterizada por um estado de inflamação crônica moderada, com aumento dos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de fase aguda (24). Tradicionalmente, o tecido adiposo é conhecido como um órgão que armazena o excesso de energia como triglicérides e libera energia como ácido graxo.

Com a descoberta da leptina em 1995, no entanto, o olhar sobre o tecido adiposo mudou consideravelmente: é agora reconhecido como um órgão endócrino que segrega uma grande variedade de hormônios, citocinas, quimiocinas e fatores que influenciam as funções vasculares e endoteliais, o apetite, a saciedade, imunidade, inflamação, o crescimento tumoral, e muitos outros processos fisiológicos (25).

A obesidade é cada vez mais associada à inflamação que é descrita neste contexto como uma inflamação de baixo grau (26) e os mecanismos fisiológicos que conectam a obesidade e a inflamação incluem a produção de uma variedade adipocinas (por exemplo, adiponectina, resistina, visfatina e leptina) e citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6 e IL-1 β pelo tecido adiposo (27, 28). Além disso, elevadas taxas de ácidos graxos livres no soro e no tecido adiposo visceral em humanos obesos, assim como em modelos animais de obesidade, têm sido mostradas para induzir sinalização pró-inflamatória e a resistência à insulina nos tecidos periféricos (29).

O controle da homeostase glicêmica, que acontece principalmente devido à regulação da responsividade à insulina, é outra importante função desempenhada pelos adipócitos. Para isso, o adipócito utiliza inúmeras vias, que se forem capazes de modificar o padrão de translocação do transportador de glicose-4 (GLUT-4) para a membrana plasmática, interferem no processo de captação de glicose e alteram o metabolismo basal destas células (30). Hoje se sabe que inúmeras moléculas são capazes de interferir nesta via, em decorrência da ativação do sistema imune inato, tal como TNF- α e LPS bacteriano proveniente da endotoxemia metabólica desencadeada pelo aumento da permeabilidade intestinal em decorrência das alterações da microbiota observadas na obesidade (31, 32).

1.3 RECEPTORES DA IMUNIDADE INATA NO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE EXPERIMENTAL

Modelos experimentais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica estão associados com um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (33, 34) e uma intensa infiltração de macrófagos com perfil pró-inflamatórios (35). O adipócito também apresenta resposta imune inata clássica associada à obesidade iniciada pela ativação de TLR2 e 4, de NF- κ B e aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (36, 37).

TLR4 pode ser ativado por ácidos graxos saturados (38). A ativação da sinalização via TLR4 induz aumento da expressão de vias inflamatórias relacionadas com a indução de resistência à insulina, tais como, c-Jun NH₂ - terminal quinase (JNK) e complexo I κ B quinase (IKK β) (21). Camundongos *knockout* (KO) para TLR4 são protegidos da resistência à insulina induzida pela obesidade, ligantes endógenos

tal como ácidos graxos livres, e LPS, sugerindo um papel importante de TLR4 na interface do sistema imune inato e o metabolismo (21, 39).

Em adipócitos, dois mecanismos diferentes também contribuem para a resistência à insulina induzida por LPS. Ativação de TLR4 por LPS em pré-adipócitos aumenta a expressão de diversas citocinas, principalmente TNF- α e IL-6, prejudicando a sinalização da insulina em adipócitos (40). O LPS, também pode promover a expressão de NF- κ B e ativação de MAPK em adipócitos (41). Além disso, um estudo sugeriu que o LPS pode promover a expressão de iNOS (40), o que também é conhecida como capaz de interferir com a sinalização da insulina (42). O efeito do óxido nítrico (NO) sobre a ação da insulina pode ser agravado pelo aumento da liberação de TNF- α e IL-6 induzida por LPS.

Da mesma forma, o TLR2 foi mostrado como um modulador importante da resistência à insulina. Caricilli et al. mostraram que a inibição a curto prazo de expressão TLR2 usando oligonucleotídeos antisense para TLR2 na dieta levava a um aumento da sensibilidade à insulina e da sinalização da insulina nos camundongos obesos (43). Outros estudos mostraram que camundongos KO para TLR2 apresentam diminuição do peso corporal e da adiposidade e eram protegidos contra a resistência à insulina e ganho de peso (44, 45).

No entanto, em colaboração com outro grupo, encontramos uma descrição metabólica oposta de camundongos TLR2 KO (46). Camundongos TLR2 KO em condições convencionais têm resistência à insulina e intolerância a glicose associada a alterações na composição da microbiota intestinal, que exibiu um aumento na abundância relativa de *Firmicutes* e *Bacteroides* e diminuição da abundância relativa *Proteobactérias*, em comparação com seus controles. A resistência à insulina de camundongos TLR2 KO foi acompanhada por uma diminuída sinalização da insulina. Apesar do fato de que estes camundongos KO e os utilizados em outros

estudos mencionados acima tinham o mesmo fundo genético, eles foram criados em salas diferentes e alimentados com alimentos de diferentes fontes, o que certamente pode ter um papel no estabelecimento e manutenção da sua microbiota intestinal (46). Dessa forma, a microbiota pode subverter uma condição geneticamente determinada anteriormente descrita como sendo de proteção para a obesidade e resistência à insulina em um fenótipo associado a ganho de peso e suas complicações, como a intolerância à glicose e diabetes (46).

Ainda, o TLR5 mostrou-se importante no desenvolvimento da obesidade. De fato, camundongos geneticamente deficientes em TLR5 apresentam alterações metabólicas correlacionadas com mudanças na composição da microbiota intestinal. Estes resultados enfatizam a visão de que a microbiota intestinal contribui para a doença metabólica e sugerem que o mau funcionamento do sistema imune inato pode promover o desenvolvimento da síndrome metabólica (47).

A participação de MyD88 também foi mostrada na obesidade, porém o seu papel é tão complexo que ainda não foi possível entender a sua real participação no desenvolvimento da obesidade. Camundongos nocautes para MyD88 desenvolvem um quadro de diabetes mais severa, e isso foi associado ao aumento *Stearoyl-CoA Desaturase 1* (SCD1), enzima importante na biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados e conhecida como um fator de risco no diabetes (48). No sistema nervoso central, a sinalização via MyD88 é indispensável para o desenvolvimento da obesidade e resistência à leptina (49).

Alterações metabólicas presentes na obesidade já foram associadas com a produção de IL-1 (50). Resultados recentes mostraram diferentes papéis para IL-1 α e IL-1 β na aterosclerose. A formação do ateroma tem sido associada à produção de IL-1 β (51). Ainda, em um modelo de obesidade induzida por dieta, camundongos IL-1R KO desenvolvem obesidade e síndrome metabólica severa comparada a

camundongos selvagens (52). A IL-18, também parece desempenhar um papel importante na síndrome metabólica. Camundongos IL-18 e IL-18R KO desenvolvem síndrome metabólica espontaneamente com a idade, tornaram-se diabéticos e resistentes à insulina (53).

A complexidade do sistema imune nos permite explorar essas vias de sinalização nos diversos órgãos, tecidos e células. Juntos, esses achados sugerem que o sistema imune inato pode determinar a sensibilidade à insulina de um animal, e que moléculas envolvidas nesse complexo sistema podem ter papéis diferentes nesse processo.

1.4 MACRÓFAGOS E DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Além do papel dos receptores da imunidade inata, uma atenção especial tem sido voltada para as células da imunidade inata no desenvolvimento da obesidade.

O remodelamento do tecido adiposo associado à obesidade foi descrito pela primeira vez em 2005 por Cinti e colaboradores pela existência de um significativo número de estruturas em coroa (do inglês *crown-like structures*) que consistem em macrófagos circundando adipócitos mortos em ambos, modelos animais de obesidade e em humanos (35).

A presença dessas estruturas em coroa foi associada à inflamação no tecido adiposo e síndrome metabólica (54). Durante o remodelamento do tecido adiposo que ocorre durante a obesidade, a morte dos adipócitos pode ser suficiente para iniciar uma massiva infiltração de macrófagos e induzir inflamação no tecido adiposo (55).

Hoje, já se sabe que os macrófagos desempenham um importante papel na manutenção da inflamação de baixo grau durante a obesidade (56, 57).

A evolução dos estudos nos permite observar uma complexa rede inflamatória no desenvolvimento da obesidade, bem como a presença de diferentes subtipos de macrófagos.

Em 2007, Lumeng et al. descreveram pela primeira vez o paradigma de macrófagos M1/M2 no tecido adiposo (58). Eles mostraram que além de aumentar em número, o fenótipo dos macrófagos é alterado de um estado anti-inflamatório (M2) para um estado pró-inflamatório (M1) durante a obesidade, o que contribuiu para o baixo grau de inflamação crônica.

Macrófagos podem ser encontrados em ambos os tecidos adiposos, subcutâneo e epididimal, embora o infiltrado seja proeminente no tecido adiposo epididimal.

Macrófagos M1 são induzidos por interferon- γ sozinho ou em conjunto com estímulos microbianos (LPS) ou citocinas, enquanto que M2 são induzidos por IL-4, IL-10, IL-13 e IL-33. No tecido adiposo, macrófagos de perfil M1 tem um papel como células efetoras e indutoras de respostas Th1 polarizadas, e medeiam a resistência contra parasitas intracelulares e tumores, enquanto que a função dos macrófagos M2 geralmente é contribuir para a remodelação do tecido (59), promoção de angiogênese e progressão de tumor (60).

Macrófagos M1 ativados são uma fonte importante de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6, que podem bloquear a ação da insulina em adipócitos via sinalização autócrina/parácrina causando resistência à insulina sistêmica. Assim, tanto o recrutamento e a polarização de macrófagos de perfil M1 são necessários para o desenvolvimento de resistência à insulina (57).

No entanto, o fenótipo dessas células foi mostrado recentemente. Macrófagos M1 e M2 no tecido adiposo são caracterizados pela presença de marcadores específicos, células F480⁺CD11b⁺CD11c⁺ são classificadas como macrófagos M1, enquanto que macrófagos M2 expressam F480⁺CD11b⁺CD206⁺ (58, 61, 62).

1.5 MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Estima-se que a microbiota humana contenha dez vezes mais bactérias do que o número de células humanas presentes (63, 64). Embora haja mais de 50 filos bacterianos descritos até o momento, o trato gastrointestinal humano é dominado por dois filos: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, enquanto *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Cyanobacteria* estão presentes em menores proporções (65).

Atualmente a microbiota tem sido associada ao desenvolvimento da obesidade (2) e além disso, a microbiota intestinal desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema imune e ajuda a manter a homeostase intestinal (2). Tanto em modelos animais, quanto em humanos, alimentação rica em gorduras é capaz de induzir alterações na microbiota e isso foi correlacionado com a gravidade da síndrome metabólica, que possui uma forte influência do sistema imune (66).

Indivíduos obesos têm uma proporção diferencial de dois principais filos da microbiota intestinal. Possuem menos *Bacteroidetes* e mais *Firmicutes*, em comparação com controles magros (67). Essa mudança na abundância relativa dos filos está associada com aumento da capacidade de captação de energia a partir de alimentos.

Outro mecanismo pelo qual a microbiota pode contribuir para alterações metabólicas é desencadeando inflamação sistêmica (68).

A microbiota intestinal desempenha um importante papel no desenvolvimento tanto do sistema imune de mucosa intestinal quanto do sistêmico, o que pode observado em estudos com camundongos livres de micro-organismos. Estes animais apresentam um número anormal de diversos tipos celulares, bem como deficiências em estruturas linfoides locais ou sistêmicas (69) e o perfil de citocinas também é alterado (70). Isso indica que a microbiota é essencial para controlar esses processos e que durante a obesidade, a alteração da microbiota pode levar a alterações no sistema imune.

Trabalhos mostraram que a microbiota intestinal de camundongos obesos pode ser responsável por alterações no estado metabólico, levando a um aumento de LPS sistêmico podendo resultar em resistência à insulina.

A confirmação disso é que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com antibióticos possuem os níveis plasmáticos de LPS em níveis normais, diminuindo a inflamação do tecido adiposo, o estresse oxidativo e melhorando os parâmetros metabólicos do diabetes e da obesidade (32). Desta forma, dietas hiperlipídicas estão associadas com o aumento da absorção de LPS, o que pode estar relacionado com mudanças na flora intestinal. Esse LPS plasmático é conhecido por ativar TLRs desencadeando a inflamação que, posteriormente, levará as alterações metabólicas como obesidade e resistência à insulina.

1.6 PERMEABILIDADE INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Embora a origem molecular do estado de baixo grau de inflamação encontrada em indivíduos obesos seja desconhecida, o LPS foi associado como o responsável pelo aparecimento de doenças metabólicas (21, 39, 71, 72).

Uma questão importante é como a gordura da dieta aumenta a absorção de LPS. Uma explicação seria que o LPS ultrapassaria a barreira intestinal por transporte transcelular por meio de células epiteliais do intestino delgado, o que pode ocorrer através das células M intestinais. Estas células são permeáveis a bactérias e macromoléculas (73).

Também tem sido relatado que TLR é expresso na superfície apical dos enterócitos e é capaz de se ligar e internalizar endotoxina purificada (74). Outro grupo também demonstrou que os enterócitos podem internalizar as bactérias gram-negativas por meio de TLR4, que medeia a fagocitose e a translocação destas bactérias *in vivo* (75).

O LPS, também pode ser internalizado pelas células epiteliais intestinais e transportado para o compartimento de Golgi do enterócito (76). Estudos recentes têm sugerido que a dieta pode desempenhar um papel importante, dado que a absorção de LPS a partir do intestino está associado com a ingestão de gordura na dieta (77). A gordura da dieta leva ao vazamento paracelular do LPS através do epitélio intestinal. Esta opinião é corroborada pela observação de que a integridade intestinal, as *tight-junctions* (78) são prejudicadas em camundongos obesos (79).

Estudos mostraram que TLR2 regula as TJ associadas à integridade da barreira epitelial intestinal e que a deficiência de TLR2 predispõe a alterações das TJs levando a inflamação da mucosa (80). Seguindo esta direção, Caricilli et al. mostraram que os camundongos TLR2 KO apresentam aumento de absorção de LPS após diminuição da expressão das TJs (46).

Na situação em que há um aumento da permeabilidade intestinal e aumento da absorção de LPS, um estado de endotoxemia metabólica é iniciado, caracterizado pela elevada concentração de LPS no soro. A origem da endotoxemia metabólica ainda não é clara, mas as evidências mostram que pode estar associada a alterações

na microbiota intestinal, levando a um aumento da ativação de vias inflamatórias e do comprometimento da sinalização da insulina.

1.7 LÂMINA PRÓPRIA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

A participação das células da lâmina própria no desenvolvimento da obesidade ainda precisa ser melhor esclarecida. Sabe-se que estas células contribuem para a homeostase intestinal através do reconhecimento bactérias comensais e produção de citocinas anti-inflamatórias. Alguns estudos com modelos de colite em camundongos MyD88 KO e MyD88 KO apenas nas células do epitélio intestinal (MyD88(Δ IEC)), demonstraram que esses camundongos não são capazes de montar uma resposta inflamatória, o que estaria agravando o quadro da doença que é desencadeada no intestino grosso (81, 82). Nesses trabalhos os autores concluem que a expressão de MyD88 no epitélio intestinal é importante para manter a homeostasia.

Fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos e células dendríticas (DCs), são as principais células envolvidas na manutenção da integridade do tecido, bem como na iniciação e controle da resposta imune inata e adaptativa, as quais são imprescindíveis (83) para a tolerância a antígenos alimentares, micro-organismos comensais e agentes patogênicos na mucosa intestinal. A desregulação desse equilíbrio resulta em um desbalanço na homeostase intestinal (84). Estes fagócitos são distribuídos nos órgãos linfóides, tais como placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (MLNs), e também são muito abundantes na lâmina própria intestinal (85), mas a classificação fenotípica destas células ainda não é totalmente conhecida.

Hoje, parece haver um consenso de que células CD11c⁺CD103⁺MHC II⁺ são as DCs “boas” da lâmina própria (86), no entanto, a controvérsia permanece sobre a

linhagem de células que expressam CX₃CR₁, se são DCs ou macrófagos, porque muitos grupos ainda se referem a elas como DCs, outros como fagócitos mononucleares, e ainda outros, como macrófagos (87).

Cada vez mais tem se descrito que numerosos subconjuntos de DCs e macrófagos existem na lâmina própria intestinal (87, 88). As DCs CD103⁺CX₃CR₁⁻CD11b⁻ (89) parecem ser a principal, se não a única população de DCs, que migra para os MLNs através de um mecanismo CCR7-dependente e são importantes para a indução de tolerância oral, bem como para a supressão da colite por células T reguladoras (T regFoxp3⁺) (85, 89-92). Estas DCs foram descritas por ter a capacidade de gerar e ativar células T CD8⁺. Além disso, são capazes de induzir a geração periférica de células T regFoxp3⁺ (93). Também, as DCs CD103⁺ têm a capacidade de produzir TGF- β (92). Kinnebrew et al. mostraram que as DCs da lâmina própria CD103⁺CD11b⁺ promovem tolerância contra antígenos alimentares e também rapidamente produzem IL-23 em resposta a flagelina na lâmina própria (94).

Macrófagos CX₃CR₁⁺ contribuem para a homeostase intestinal através da produção de citocinas anti-inflamatórias e reconhecimento das bactérias comensais que ultrapassam a barreira epitelial (95). Estas células também parecem desempenhar um importante papel no processo de indução de tolerância oral, expandindo células T reg Foxp3⁺ (96).

Medina-Contreras et al. (97) demonstraram um importante papel para o CX₃CR₁ em manter populações de macrófagos da lâmina própria, impedindo a translocação de bactérias comensais para os MLNs limitando respostas Th17 na colite. Camundongos KO para CX₃CR₁ tiveram reduzida frequência de macrófagos da lâmina própria e estes KO exibiram acentuadamente maior translocação de

bactérias comensais para MLNs. Além disso, a gravidade da colite induzida por DSS foi drasticamente aumentada nos KOs em comparação com os controles.

Ainda, células de Paneth secretam alfa defensinas tais como DEF1 no intestino, bem como outros agentes antimicrobianos tais como REG III na camada mucosa (98). Estas células protegem todo o epitélio intestinal de infecções microbianas e regulam a colonização bacteriana do intestino (98). Alfa defensinas são os produtos mais abundantes secretados pelas células de Paneth (99) e os principais indutores são os produtos de degradação das bactérias do intestino. A sua presença na camada mucosa do epitélio intestinal é constantemente monitorada pelos receptores de reconhecimento de padrões moleculares que são expressos em células de Paneth e enterócitos como TLRs e NLRs (100). As alfa defensinas geram uma resposta anti-inflamatória moderada no intestino suprimindo IL-1 β em resposta ao LPS bacteriano (101). Além desta resposta anti-inflamatória que é benéfica, os microrganismos são capazes de bloquear a expressão de alfa defensinas entéricas e outras substâncias antimicrobianas pelas células de Paneth usando mecanismos ainda desconhecidos, podendo então causar inflamação.

Recentemente, tem sido mostrado que a microbiota intestinal proporciona estímulos essenciais e sinais necessários para a indução de peptídeos antimicrobianos (102).

O peptídeo antimicrobiano REGIII parece ser alterado em camundongos nocautes para os receptores intracelulares NOD-1 e NOD-2, no entanto, não é claro se um componente específico da microbiota intestinal regula a expressão de proteínas REG III pelas células intestinais (103). Estudos relataram que camundongos transgênicos para MyD88 no intestino reduziu a expressão de peptídeos antimicrobianos no intestino delgado e aumento da translocação bacteriana para os MLNs. A sinalização via MyD88 pode fornecer sinais diretos e

indiretos para aumentar a produção de fatores antimicrobianos que segregam a microbiota dos tecidos do hospedeiro (103).

Além das células da lâmina própria, a deleção de MyD88 em células não hematopoiéticas, tal como células epiteliais intestinais, resulta em imunidade comprometida a infecções bacterianas, o que implica a estas células mediar o reconhecimento de bactérias, o que é um processo chave para o desenvolvimento de respostas imunes protetoras no trato gastrointestinal (104).

No entanto, o reconhecimento de bactérias comensais por células epiteliais e também por células hematopoiéticas é essencial para manter a homeostase intestinal. Nas células do epitélio intestinal, o reconhecimento das bactérias comensais deve ocorrer sem iniciar uma resposta imune, o que sugere que os receptores da imunidade inata não são os únicos responsáveis por discriminar comensais de patogênicos. Também, os micro-organismos comensais são capazes de modular a sinalização nas células do epitélio intestinal. Por exemplo, embora as bactérias patogênicas induzam a ativação de NF- κ B via TLRs *in vitro*, estudos demonstraram que as bactérias comensais, tais como *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.* e algumas espécies de *Escherichia coli* podem inibir esta via (105).

Todos esses dados nos remetem o papel do sistema imunológico em controlar alterações metabólicas por si só, ou levando a alterações na microbiota intestinal. Por outro lado, alterações da microbiota intestinal também podem controlar a homeostase do sistema imune e o desenvolvimento da síndrome metabólica.

Atualmente, as atenções estão voltadas para o estudo da interação do sistema imune com o desenvolvimento das doenças metabólicas. Visto que a obesidade é uma epidemia global crescente, é de extrema importância que possamos colaborar para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento destas

doenças. A imunidade inata é a nossa primeira linha de defesa, e foi nela que decidimos focar.

MyD88 é uma molécula de sinalização essencial para a maioria dos TLRs e é essencial para a indução de citocinas pró-inflamatórias (106, 107). Além disso, acreditamos que a sinalização via MyD88 no intestino poderia participar através da modulação da microbiota, que conseqüentemente influenciaria o processo via alça de *feedback* na sinalização via MyD88 no intestino. Ademais, considerando que é evidente a partir de modelos de obesidade que adipócitos e macrófagos localizados no tecido adiposo produzem mediadores pró-inflamatórios, os *links* entre a inflamação, recrutamento e ativação de macrófagos necessitam ser melhor compreendidos, em especial pela participação na regulação do metabolismo que vem sendo atribuída a TLRs. Desta forma, neste trabalho, nós formulamos a hipótese de que a sinalização via MyD88 regularia o desenvolvimento da obesidade, desempenhando um papel importante nos processos metabólicos, como o desenvolvido de resistência à insulina, via modulação do processo inflamatório, em especial em macrófagos e via alterações na interface microbiota-intestino, com impactos na geração de uma resposta inflamatória local e sistêmica.

7 CONCLUSÕES

- MyD88 desempenha um papel importante na obesidade e na manutenção de uma resposta imune eficiente;
- A ausência de MyD88 leva a um aumento da resistência à insulina, permeabilidade intestinal, e da frequência de macrófagos de perfil M1 no tecido adiposo;
- A expressão de MyD88 exclusivamente no tecido adiposo não altera o desenvolvimento da obesidade;
- A expressão MyD88 exclusivamente em macrófagos está envolvida no desenvolvimento da obesidade;
- A microbiota intestinal dos camundongos MyD88 KO é suficiente para induzir resistência à insulina em camundongos WT; e
- A via da dectina parece estar relacionada com o desenvolvimento da obesidade através da secreção de IFN- β .

REFERÊNCIAS*

1. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews*. 2001;1(2):135-45.
2. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
3. Spelman K, Burns J, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review*. 2006;11(2):128-50.
4. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 2004;16(1):3-9.
5. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:197-216.
6. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews*. 2009;227(1):221-33.
7. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(16):9237-42.
8. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
9. Shishido T, Nozaki N, Takahashi H, Arimoto T, Niizeki T, Koyama Y, et al. Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;345(4):1446-53.
10. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102(7):2660-9.
11. Park JM, Brady H, Ruocco MG, Sun H, Williams D, Lee SJ, et al. Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes & Development*. 2004;18(5):584-94.

¹ * De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

12. Uehori J, Fukase K, Akazawa T, Uematsu S, Akira S, Funami K, et al. Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *The Journal of Immunology*. 2005;174(11):7096-103.
13. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice*. 2007;4(8):444-54.
14. Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):511-24.
15. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *The Journal of Immunology* 2006;177(10):7155-63.
16. Nyirenda MH, Morandi E, Vinkemeier U, Constantin-Teodosiu D, Drinkwater S, Mee M, et al. TLR2 Stimulation Regulates the Balance between Regulatory T Cell and Th17 Function: A Novel Mechanism of Reduced Regulatory T Cell Function in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology* 2015;194(12):5761-74.
17. Dasgupta G, Chentoufi AA, You S, Falatoonzadeh P, Urbano LA, Akhtarmalik A, et al. Engagement of TLR2 reverses the suppressor function of conjunctiva CD4+CD25+ regulatory T cells and promotes herpes simplex virus epitope-specific CD4+CD25- effector T cell responses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52(6):3321-33.
18. Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Jurnal of Immunology* 2005;175(12):8051-9.
19. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews*. 2008;223(1):20-38.
20. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(11):3015-25.
21. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(8):1986-98.
22. Nammi S, Koka S, Chinnala KM, Boini KM. Obesity: an overview on its current perspectives and treatment options. *Nutrition Journal*. 2004;3:3.
23. World Health Organization . Obesity and overweight. Report. Geneva. 2015; 311:1

24. Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research*. 2003;11(4):525-31.
25. Schaffler A, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Buchler C. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocrine Reviews*. 2006;27(5):449-67.
26. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
27. Juge-Aubry CE, Somm E, Chicheportiche R, Burger D, Pernin A, Cuenod-Pittet B, et al. Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(6):2652-8.
28. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12):1785-8.
29. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes*. 2005;54(12):3458-65.
30. Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2000;24 Suppl 4:S23-7.
31. Greenberg AS, McDaniel ML. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*. 2002;32 Suppl 3:24-34.
32. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
33. Trayhurn P. Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue. *Endocrinology*. 2005;146(3):1003-5.
34. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83(2):461S-5S.
35. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*. 2005;46(11):2347-55.

36. Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(32):24255-63.
37. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology*. 2007;292(3):E740-7.
38. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
39. Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;346(3):739-45.
40. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
41. Chung S, Lapoint K, Martinez K, Kennedy A, Boysen Sandberg M, McIntosh MK. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology*. 2006;147(11):5340-51.
42. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005;54(4):959-67.
43. Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, Tsukumo DM, Velloso LA, Carvalheira JB, et al. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *The Journal of Endocrinology*. 2008;199(3):399-406.
44. Himes RW, Smith CW. Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *Faseb Journal*. 2010;24(3):731-9.
45. Kuo LH, Tsai PJ, Jiang MJ, Chuang YL, Yu L, Lai KT, et al. Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse. *Diabetologia*. 2010;54(1):168-79.
46. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS biology*. 2011;9(12):e1001212.

47. 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.
48. Yokoyama S, Hosoi T, Ozawa K. Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) is a key factor mediating diabetes in MyD88-deficient mice. *Gene*. 2012;497(2):340-3.
49. Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, et al. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metabolism*. 2009;10(4):249-59.
50. Tack CJ, Stienstra R, Joosten LA, Netea MG. Inflammation links excess fat to insulin resistance: the role of the interleukin-1 family. *Immunological Reviews*. 2012;249(1):239-52.
51. Freigang S, Ampenberger F, Weiss A, Kanneganti TD, Iwakura Y, Hersberger M, et al. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1 α and sterile vascular inflammation in atherosclerosis. *Nature Immunology*. 2013;14(10):1045-53.
52. Garcia MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, Hultgren O, et al. Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. *Diabetes*. 2006;55(5):1205-13.
53. Netea MG, Joosten LA, Lewis E, Jensen DR, Voshol PJ, Kullberg BJ, et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nature Medicine*. 2006;12(6):650-6.
54. Aouadi M, Tencerova M, Vangala P, Yawe JC, Nicoloso SM, Amano SU, et al. Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(20):8278-83.
55. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic care*. 2010;13(4):371-6.
56. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual Review of Physiology*. 2010;72:219-46.
57. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12):1796-808.
58. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(1):175-84.

59. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*. 2013;229(2):176-85.
60. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 2010;11(10):889-96.
61. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews*. 2003;3(1):23-35.
62. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004;25(12):677-86.
63. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-48.
64. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):65-80.
65. 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.
66. Lam YY, Ha CW, Hoffmann JM, Oscarsson J, Dinudom A, Mather TJ, et al. Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. *Obesity*. 2015;2(1):10.1002/oby.21122.
67. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(31):11070-5.
68. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005;307(5717):1920-5.
69. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews*. 2004;4(6):478-85.
70. Ishikawa H, Tanaka K, Maeda Y, Aiba Y, Hata A, Tsuji NM, et al. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25⁺ CD4⁺ T cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008;153(1):127-35.
71. 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.
72. Saito T, Hayashida H, Furugen R. Comment on: Cani et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance: *Diabetes* 56:1761-1772. *Diabetes*. 2007;56(12):e20; author reply e1.

73. Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP. The role of M cells in mucosal immunity. *Cellular and Molecular Life Science*. 2000;57(2):323-32.
74. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *The Journal of Immunology* 2000;164(2):966-72.
75. Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *The Journal of Immunology*. 2006;176(5):3070-9.
76. Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(5):559-70.
77. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007;86(5):1286-92.
78. Hodin CM, Verdam FJ, Grootjans J, Rensen SS, Verheyen FK, Dejong CH, et al. Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *The Journal of Pathology*. 2011;225(2):276-84.
79. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu 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. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1359-74.
81. Frantz AL, Rogier EW, Weber CR, Shen L, Cohen DA, Fenton LA, et al. Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunology*. 2012;5(5):501-12.
82. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41.
83. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews*. 2008;8(6):411-20.

84. Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*. 2009;31(3):502-12.
85. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews*. 2008;8(6):435-46.
86. Rescigno M. Intestinal dendritic cells. *Advances in Immunology*. 2010;107:109-38.
87. Pabst O, Bernhardt G. The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages. *European Journal of Immunology*. 2010;40(8):2107-11.
88. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *The Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(1):139-55.
89. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*. 2009;31(3):513-25.
90. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(13):3101-14.
91. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(3):519-27.
92. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(8):1757-64.
93. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Forster R, et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005;202(8):1063-73.
94. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner I, Hohl TM, et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity*. 2012;36(2):276-87.
95. Bain CC, Mowat AM. Intestinal macrophages - specialised adaptation to a unique environment. *European Journal of Immunology*. 2011;41(9):2494-8.

96. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, et al. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*. 2011;34(2):237-46.
97. Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, et al. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(12):4787-95.
98. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjoberg J, Amir E, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature immunology*. 2010;11(1):76-83.
99. Uematsu S, Fujimoto K. The innate immune system in the intestine. *Microbiology and Immunology*. 2010;54(11):645-57.
100. Choi YJ, Im E, Chung HK, Pothoulakis C, Rhee SH. TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;285(48):37570-8.
101. Shi J, Aono S, Lu W, Ouellette AJ, Hu X, Ji Y, et al. A novel role for defensins in intestinal homeostasis: regulation of IL-1beta secretion. *The Journal of Immunology* 2007;179(2):1245-53.
102. Mukherjee S, Vaishnava S, Hooper LV. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cellular and Molecular Life Science*. 2008;65(19):3019-27.
103. Natividad JM, Hayes CL, Motta JP, Jury J, Galipeau HJ, Philip V, et al. Differential Induction of Antimicrobial REGIII by the Intestinal Microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(24):7745-54.
104. Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(8):1891-900.
105. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science*. 2000;289(5484):1560-3.
106. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell death and differentiation*. 2006;13(5):816-25.
107. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301(5633):640-3.

108. 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.
109. Konner AC, Bruning JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2011;22(1):16-23.
110. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365(9467):1333-46.
111. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*. 2002;8(11):1288-95.
112. Golubovic MV, Dimic D, Antic S, Radenkovic S, Djindjic B, Jovanovic M. Relationship of adipokine to insulin sensitivity and glycemic regulation in obese women--the effect of body weight reduction by caloric restriction. *Vojnosanitetski Pregled*. 2013;70(3):284-91.
113. Farache J, Zigmond E, Shakhar G, Jung S. Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunology and Cell Biology*. 2013;91(3):232-9.
114. Yaegashi M, Jean R, Zuriqat M, Noack S, Homel P. Outcome of morbid obesity in the intensive care unit. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2005;20(3):147-54.
115. Vachharajani V, Vital S. Obesity and sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2006;21(5):287-95.
116. Hsu A, Aronoff DM, Phipps J, Goel D, Mancuso P. Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007;150(2):332-9.
117. Kaplan JM, Nowell M, Lahni P, O'Connor MP, Hake PW, Zingarelli B. Short-term high fat feeding increases organ injury and mortality after polymicrobial sepsis. *Obesity*. 2012;20(10):1995-2002.
118. Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi EJ, Correa-Silva R, et al. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PloS one*. 2011;7(5):e37584.
119. Sonogo F, Castanheira FV, Czaikoski PG, Kanashiro A, Souto FO, Franca RO, et al. MyD88-, but not Nod1- and/or Nod2-deficient mice, show increased susceptibility to polymicrobial sepsis due to impaired local inflammatory response. *PloS one*. 2014;9(8):e103734.

120. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2001;60(3):329-39.
121. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews*. 2006;6(1):33-43.
122. Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, et al. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *eLife*. 2015;3(1):e04177.
123. Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Sanjuan G, Suzuki Y, Ortega L, et al. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(8):1864-70.
124. Kim SJ, Choi Y, Choi YH, Park T. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(2):113-22.
125. Purohit JS, Hu P, Chen G, Whelan J, Moustaid-Moussa N, Zhao L. Activation of nucleotide oligomerization domain containing protein 1 induces lipolysis through NF-kappaB and the lipolytic PKA activation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2013;91(6):428-34.
126. Ballak DB, van Asseldonk EJ, van Diepen JA, Jansen H, Hijmans A, Joosten LA, et al. TLR-3 is present in human adipocytes, but its signalling is not required for obesity-induced inflammation in adipose tissue in vivo. *PloS one*. 2015;10(4):e0123152.
127. McGee KC, Harte AL, da Silva NF, Al-Daghri N, Creely SJ, Kusminski CM, et al. Visfatin is regulated by rosiglitazone in type 2 diabetes mellitus and influenced by NFkappaB and JNK in human abdominal subcutaneous adipocytes. *PloS one*. 2011;6(6):e20287.
128. Ehses JA, Meier DT, Wueest S, Rytka J, Boller S, Wielinga PY, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia*. 2010;53(8):1795-806.
129. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British Journal of Nutrition*. 2004;92(3):347-55.
130. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*. 2008;29(24):2959-71.

131. Mlinar B, Marc J. New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011;49(12):1925-35.
132. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews*. 2005;5(12):953-64.
133. Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2014;19(3):512-26.
134. Shang Q, Bai Y, Wang G, Song Q, Guo C, Zhang L, et al. Delivery of Adipose-derived Stem Cells Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Obese Mice through Remodeling Macrophage Phenotypes. *Stem Cells and Development*. 2015;4(7):1232-40.
135. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exercise Immunology Review*. 2010;16(1):105-18.
136. Borgeson E, Johnson AM, Lee YS, Till A, Syed GH, Ali-Shah ST, et al. Lipoxin A Attenuates Obesity-Induced Adipose Inflammation and Associated Liver and Kidney Disease. *Cell Metabolism*. 2015;1(15):00215-6.
137. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94.
138. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474(7351):298-306.
139. Hausmann M. How bacteria-induced apoptosis of intestinal epithelial cells contributes to mucosal inflammation. *International Journal of Inflammation*. 2010;2010:574568.
140. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *Journal of Parental and Enteral Nutrition*. 2011;35(5 Suppl):14S-20S.
141. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine*. 2009;1(6):6ra14.
142. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Current Microbiology*. 2010;61(1):69-78.

143. Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, Lawson MA, et al. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science*. 2009;325(5940):617-20.
144. del Fresno C, Soulat D, Roth S, Blazek K, Udalova I, Sancho D, et al. Interferon-beta production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. *Immunity*. 2013;38(6):1176-86.
145. Weiss M, Blazek K, Byrne AJ, Perocheau DP, Udalova IA. IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013(1):245804.
146. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine*. 1996;334(5):292-5.