



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

BRUNA BOMBASSARO

A PROTEÍNA CD1 MEDEIA A INFLAMAÇÃO HIPOTALÂMICA NA OBESIDADE  
INDUZIDA POR DIETA

*CD1 PROTEIN IS INVOLVED IN DIET-INDUCED HYPOTHALAMIC  
INFLAMMATION IN OBESITY*

CAMPINAS

2018

BRUNA BOMBASSARO

A PROTEÍNA CD1 MEDEIA A INFLAMAÇÃO HIPOTALÂMICA NA OBESIDADE  
INDUZIDA POR DIETA

*CD1 PROTEIN IS INVOLVED IN DIET-INDUCED HYPOTHALAMIC  
INFLAMMATION IN OBESITY*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Thesis presented to the School of Medical Sciences of the University of Campinas as part of the requirements to obtain the Doctorate Degree of Science.

ORIENTADOR: LICIO AUGUSTO VELLOSO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA BRUNA BOMBASSARO E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO.

CAMPINAS

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2013/25415-9

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

Bombassaro, Bruna, 1989-  
B639p A proteína CD1 medeia a inflamação hipotalâmica na obesidade induzida por dieta / Bruna Bombassaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Licio Augusto Velloso.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Hipotálamo. I. Velloso, Licio Augusto, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** CD1 protein is involved in diet-induced hypothalamic inflammation in obesity

**Palavras-chave em inglês:**

Obesity

Inflammation

Hypothalamus

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Licio Augusto Velloso [Orientador]

Gabriel Forato Anhe

Liana Maria Cardoso Verinaud

Alexandre Alarcon Steiner

Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader

**Data de defesa:** 14-08-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**BRUNA BOMBASSARO**

---

**ORIENTADOR PROF DR LICIO AUGUSTO VELLOSO**

---

## **MEMBROS:**

**1. PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO**

**2. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHE**

**3. PROF.(A) DR.(A) LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD**

**4. PROF.DR. ALEXANDRE ALARCON STEINER**

**5.PROF.DR. FERNANDO RODRIGUES DE MORAES ABDULKADER**

---

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

**Data: 14/08/2018**

*Dedico essa tese aos meus mestres.*

*Aos meus primeiros e eternos mestres, meus pais, que dedicaram e dedicam suas vidas ao meu crescimento e formação, orgulhos da jornada que desenho a cada dia;*

*Ao meu orientador, Professor Licio Velloso, por me ensinar e me incentivar na vida acadêmica.*

*Ao meu marido, Christiano, por me ensinar a dedicação e paixão pela carreira escolhida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Licio Augusto Velloso, por todo ensinamento, paciência e dedicação;

À minha família, pelo apoio incondicional;

Aos meus amigos e colaboradores do laboratório, cujas mãos e risadas foram essências.

À FAPESP, pelo apoio financeiro a este projeto, processo nº 2013/25415-9, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## RESUMO

Obesidade é hoje o principal fator de risco para uma série de doenças e o aumento de sua prevalência é alarmante. A ativação de um processo inflamatório subclínico no hipotálamo desempenha papel central como desencadeador dos distúrbios associados ao ganho de peso, como a resistência à insulina. A ativação do processo inflamatório característico da obesidade decorre da complexa associação entre fatores genéticos e ambientais. O consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados é certamente um dos mais importantes fatores ambientais, levando à inflamação através da ativação de receptores TLR4. A participação do sistema imune inato nessa inflamação hipotalâmica tem sido extensivamente estudada. No entanto, o papel da imunidade adaptativa no curso da obesidade é ainda desconhecido. Em doenças neurodegenerativas, a inflamação do sistema nervoso central é responsável pela atração e ativação de linfócitos T, sendo este evento concomitante ao início da doença. Conhecendo o papel dos ácidos graxos nesse cenário imunológico, nós aventamos a hipótese de que o CD1, proteína que apresenta lipídios a células T, teria papel relevante na resposta imune adaptativa no hipotálamo de camundongos obesos. Neste trabalho, mostramos que com poucos dias de dieta, ocorre um aumento da expressão hipotalâmica de CD1 e modificação de sua distribuição anatômica. A redução da sua expressão utilizando um anticorpo imunoneutralizador acarreta em melhora do perfil glicêmico e redução do ganho de peso enquanto sua ativação no hipotálamo exacerba o fenótipo obeso dos animais, inclusive levando animais resistentes à obesidade a apresentarem um perfil de ganho de peso semelhante a animais propensos. A análise por bioinformática revelou que a expressão de CD1 no hipotálamo se correlaciona a outros marcadores envolvidos no distúrbio. Dessa forma, o CD1 parece exercer papel relevante na inflamação hipotalâmica frente ao consumo de ácidos graxos saturados.

## ABSTRACT

Obesity is the main risk factor for many comorbidities and its prevalence is rising to astounding numbers. The activation of a subclinical and chronic inflammatory process in the hypothalamus has been shown to be the trigger event leading to several comorbidities, such as insulin resistance and diabetes. This process occurs due to a complex interaction between genetic and environmental factors. The consumption of saturated fatty acid rich diets is one of the most important environmental factors, leading to inflammation due to activation of the innate immune receptor, TLR4. The role of innate immune response in the hypothalamic inflammation has been extensively studied. However, the putative role of the adaptive immune response in this scenario is still unknown. In neurodegenerative diseases, the inflammation is responsible for the recruitment and activation of T lymphocytes to the brain, which contributes to the emergence of many symptoms of the diseases. As we know that fatty acids trigger an inflammatory immune response that disrupts hypothalamic control of food intake and energy homeostases, we hypothesized that CD1, a lipid-presenting protein to lymphocytes, would play a central role in the hypothalamic immune response. In this work, we show that as early as one day of high fat diet, the CD1 expression is higher in the hypothalamus of mice and the distribution in this tissue is also disturbed. The decrease in CD1 expression leads to improvement of glucose tolerance and reduced weight gain; whereas the increase of CD1 signaling exacerbates the obese phenotype. Bioinformatics analyses showed that the hypothalamic expression of CD1 correlates with other cellular mechanisms involved in the pathophysiology of obesity. Therefore, CD1 seems to have a pivotal role in hypothalamic inflammation due to saturated fatty acids consumption.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP	Agouti-related peptide (peptídeo relacionado a Agouti)
APC	Antigen Presenting Cell (Célula Apresentadora de Antígeno)
CART	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (transcrito regulado por cocaína e anfetamina)
CCK	Cholecystokinin (Colecistocinina)
GLP1	Glucagon-like peptide-1 (Peptídeo semelhante a Glucagon-1)
HFD	High-Fat Diet (Dieta rica em gordura)
ICV	Intracerebroventricular
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS1	Insulin receptor substrate 1 (substrato 1 do receptor de insulina)
JNK	c-Jun N-terminal kinase (quinase c-Jun N-terminal)
LPS	Lipopolissacarídeo
PVN	Paraventricular Nucleus (Núcleo Paraventricular)
MC4R	Melanocortin 4 receptor (receptor de melanocortina 4)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
NPY	Neuropeptide Y (neuropeptídeo y)
PIB	Produto Interno Bruto
POMC	Pro-opiomelanocortin (pró-opiomelanocortina)

SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS3 sinalização de citocina)	Suppressor of cytokine signaling 3 (suppressor 3 da
TCR	T-Cell Receptor (receptor da célula T)
Th1/2	T helper1/2 (célula T auxiliadora)
TLR4	Toll-like receptor 4 (receptor 4 semelhante a Toll)
TNF $\alpha$ alpha)	Tumor Necrose Factor alpha (Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

Introdução.....	12
Objetivos.....	20
Metodologia.....	21
Resultados – Artigo.....	25
Discussão Geral.....	63
Conclusão.....	67
Referências.....	68
Anexos.....	74

## 1.0 INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade vem crescendo em todo o mundo de forma alarmante, ganhando *status* de pandemia e se tornando fonte de preocupação devido a seu impacto na saúde pública. No decorrer da história, os hábitos de vida da população se alteraram continuamente, acompanhando importantes mudanças sócio-econômicas. Na primeira metade do século XX, a mecanização, a urbanização e a mudança dos hábitos alimentares contribuíram consideravelmente para que ocorresse um aumento do número de pessoas com sobrepeso e obesas na população (1). Nos últimos 20 anos, o avanço na indústria alimentícia acarretou no aumento da disponibilidade de alimentos hipercalóricos, fato decisivo para o crescimento da obesidade (2) que representa hoje o principal fator de risco para uma série de comorbidades. Valores altos de IMC (Índice de Massa Corporal) foram associados a pelo menos quatro milhões de mortes em 2015 (3).

Os dados dessa pandemia são assustadores. A Organização Mundial de Saúde divulgou que em 2016, 1,9 bilhão (39%) de adultos estavam com sobrepeso no mundo e desses, mais de 650 milhões já eram obesos (13%) (4). O Ministério da Saúde, em pesquisa feita em 2016, revelou que no Brasil a obesidade passou de 11,8% em 2006 para 18,9% dez anos depois (5).

A obesidade é, *per se*, responsável pelo desenvolvimento de uma série de doenças que contribuem para morbidade e mortalidade em quase todos os países do mundo. Das causas de morte em decorrência do excesso de peso, as doenças cardiovasculares lideram o ranking, sendo responsáveis por 2,7 milhões, seguida pelo diabetes, responsável por 600 milhões (3). Além do impacto social, essas comorbidades impactam diretamente na esfera econômica. No Brasil, a obesidade e problemas a ela relacionados consumiram em 2014, 2,4% do PIB (6); o diabetes representou um fardo de \$176 bilhões de dólares em assistência médica e \$69 bilhões em redução da produtividade em 2012 só nos Estados Unidos (7). Em 2017, esses dados alcançaram \$237 bilhões e \$90 bilhões, respectivamente (8).

Os recentes avanços farmacológicos têm falhado na missão de levar a uma perda de peso considerável e mais importante, em manter esse *status* ao longo dos anos. Em geral, o emagrecimento obtido com as diferentes estratégias farmacológicas e comportamentais não ultrapassa 7% da massa corporal e uma grande parte desse peso perdido é readquirido após algum tempo (9; 10). Diversos estudos ao longo das últimas décadas vêm tentando elucidar por quais mecanismos anatomofuncionais é tão difícil a manutenção do emagrecimento (11). A relação entre obesidade, dieta e os distúrbios

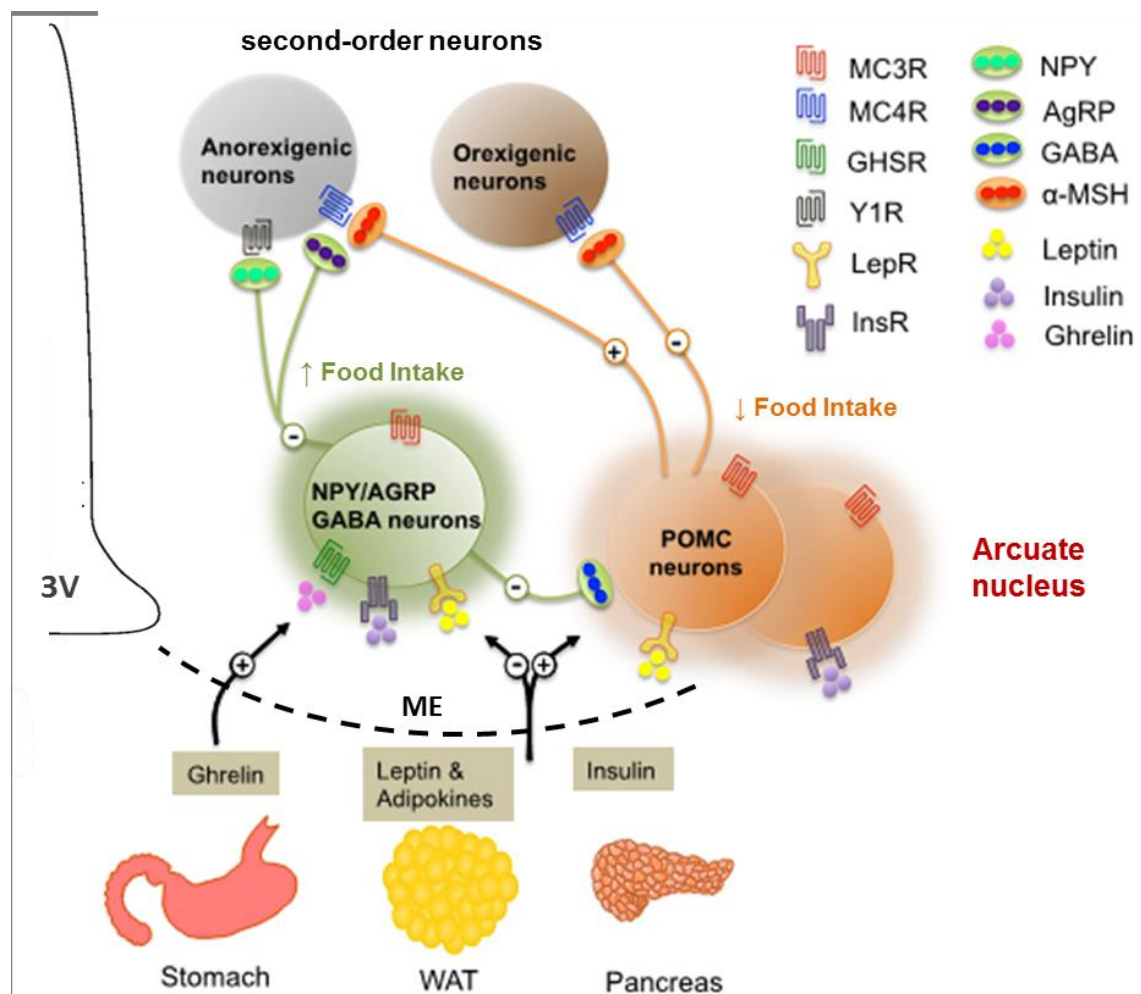
metabólicos associados tem o hipotálamo como centralizador do problema. Sendo o sensor metabólico e controlador do gasto energético e da fome, essa região do cérebro é determinante no desenvolvimento do desbalanço energético que resulta em obesidade.

A atividade neural que controla o equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto calórico é exercida, em parte, por grupos especializados de neurônios encontrados no hipotálamo (12, 13). Tais células respondem a estímulos oriundos da periferia que informam a respeito do estado nutricional e das reservas energéticas do corpo. Hormônios, como a leptina e a insulina, tem papel fundamental no controle da adiposidade enquanto hormônios produzidos por células do trato digestório como GLP1, CCK, grelina e somatostatina, participam do controle imediato da saciedade (14, 15). O papel do hipotálamo no controle dos estoques de energia e no metabolismo começou a ser elucidado observando-se que lesões nesse órgão levavam tanto a hiperfagia e obesidade, se a região lesionada era o hipotálamo ventromedial, quanto à hipofagia, perda de peso e até mesmo morte por inanição, quando o dano ocorria na região lateral (16, 17).

Em 1959, Hervey, em experimentos de parabiose com ratos, nos quais os roedores têm seus vasos sanguíneos compartilhados, demonstrou que animais obesos, devido a lesões hipotalâmicas, ligados a animais magros, levavam a hipofagia e emagrecimento dos últimos, demonstrando que fatores circulantes presentes no animal obeso eram funcionais nos magros, concluindo que lesões hipotalâmicas impediam a resposta correta desses fatores (18). Nas décadas seguintes, outros autores trabalhando também com parabiose, confirmaram a presença de fatores circulantes atuando como reguladores da fome e metabolismo (19). A confirmação do cérebro como cerne regulador veio anos depois. Utilizando um peptídeo isolado do cérebro de suínos, semelhante a peptídeos intestinais e pancreáticos, nomeado NPY (Neuropeptídeo Y), Clark e colaboradores observaram aumento expressivo na ingestão alimentar quando injetado intracerebroventricularmente (ICV) em ratos (20). No mesmo ano, Stanley e Leibowitz demonstraram que o efeito era ainda mais pronunciado quando o NPY era administrado diretamente no Núcleo Paraventricular (PVN), demonstrando a integração de vários núcleos hipotalâmicos no controle energético (21). Dez anos depois, a descrição da distribuição do receptor de melanocortina 4 (MC4R) no sistema nervoso central sugeriu um papel neuroendócrino desse sistema ainda pouco conhecido (22). Em 1997, o *knockout* desse receptor em modelos animais evidenciou o papel desse sistema no controle da fome, já que os mesmos eram hiperfágicos e obesos (23). Ainda nesse ano foi descrito o AgRP (Agouti-Related Protein) (24, 25,26), identificado como um peptídeo expresso em neurônios ativados em um *status* de baixo aporte energético, juntamente ao então já conhecido, NPY (27), estimulando a ingestão e o ganho de peso. O *knockout* de outro componente do sistema de

melanocortina, o POMC (Pro-opimelanocortina), trouxe à luz mais um peptídeo hipotalâmico envolvido no controle da fome, cujo resultado da deleção era hiperfagia, redução do gasto energético e obesidade (28).

Dessa forma, ao longo dos últimos 30 anos, houve grande avanço na compreensão de como o controle do metabolismo energético pelos núcleos hipotalâmicos e como os sinais oriundos da periferia sinalizam sobre o *status* energético do indivíduo. Hoje sabemos que grupos de neurônios de primeira ordem, localizados no Núcleo Arqueado, recebem as informações periféricas, principalmente insulina e leptina, e coordenam as respostas enviando sinais excitatórios ou inibitórios para neurônios de segunda ordem, localizados no Núcleo Paraventricular e Hipotálamo Lateral (29, 30); NPY e AgRP, estimulados quando as concentrações plasmáticas de insulina e leptina são baixas, ou seja, no jejum, são responsáveis pelos sinais de primeira ordem orexigênicos, estimulando a ingestão alimentar e reduzindo o gasto energético; enquanto os neurônios POMC e CART, também no Núcleo Arqueado, tem maior atividade após as refeições e exercem ações antagônicas aos neurônios orexigênicos, sendo portanto anorexigênicos, diminuindo a ingestão alimentar (13, 14) (fig1).



**Figura 1:** Representação esquemática dos grupos de neurônio de 1ª e 2ª ordem que controlam a fome e o gasto energético no hipotálamo (*Adaptado de Jeong J.K. et al, Cell. Mol. Life Sci, 2014* )

Avanços na caracterização dos mecanismos centrais de controle central da fome e do gasto energético trouxe a idéia de que a leptina e a insulina seriam óbvios alvos terapêuticos para a obesidade. No entanto, logo se entendeu que durante o desenvolvimento da obesidade há uma perda na resposta funcional a estes hormônios. Observou-se que pacientes com diabetes tipo 2 são hiperinsulinêmicos e ainda assim, obesos (31) e que roedores magros tratados com leptina apresentam redução da ingestão alimentar enquanto que modelos de obesidade não respondem da mesma forma (32). A resposta hipotalâmica deficiente a nutrientes e hormônios ocorre também em seres humanos obesos (33, 34) trazendo assim uma nova evidência: indivíduos obesos são resistentes à sinais periféricos.

A presença de um quadro inflamatório subclínico, com recrutamento de células imunes, produção de citocinas inflamatórias com conseqüente resistência à ação da insulina em tecidos periféricos como fígado, músculo e tecido adiposo (35) foi importante para compreender como esse processo ocorria também no hipotálamo. A ação destas citocinas, a exemplo TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , (36) sobre a resistência à leptina e insulina fica clara quando se observa que tanto uma dieta hiperlipídica quanto o tratamento com TNF $\alpha$  por si só levam a ativação das serina-quinases IKK e JNK, que fosforilam o substrato do receptor de insulina, IRS1, em resíduos de serina, levando à sua inibição (37). Essas citocinas levam também ao aumento da expressão de proteínas SOCS3, que atuam tanto sobre o receptor de leptina, se ligando ao seu sítio ativo e impedindo sua ação (38) quanto por meio de sua atividade de ubiquitina-ligase, levando o IRS1 à degradação pelo proteossoma (39).

O início dessa resposta imune anômala tem como ator principal os ácidos graxos saturados. Isso porque, em decorrência de sua estrutura molecular, os ácidos graxos saturados são capazes de ativar receptores característicos do sistema imune inato, receptores presentes inclusive na microglia no sistema nervoso central (40). Milanski e cols (2009) demonstraram que ácidos graxos saturados são capazes de ativar vias inflamatórias no hipotálamo através de receptores do tipo TLR4 (Toll-like receptor 4) (41). Os TLRs fazem parte de uma família muito conservada de receptores capazes de gerar resposta imune através do reconhecimento de padrões comuns a classes de micro-organismos. O TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias gram-negativas, levando a produção de citocinas e a ativação de genes relacionados a resposta imune (42). A semelhança entre os ácidos graxos da dieta com o LPS permite que uma dieta rica nesse nutriente ative vias inflamatórias no hipotálamo e em vários outros órgãos metabolicamente importantes, levando ao prejuízo na sinalização da insulina e da leptina. Em camundongos, a resposta à dieta hiperlipídica no hipotálamo é tão rápida quanto um dia, resultando em

níveis elevados na expressão de citocinas inflamatórias, como TNF $\alpha$  (43). Logo no início do consumo de dietas ricas em ácidos graxos, o aumento na expressão de quimiocinas no hipotálamo também corrobora com a evidência de uma inflamação com recrutamento de células imunes (44) e a importância dessa resposta fica clara quando a manipulação da expressão de uma única quimiocina hipotalâmica é suficiente para alterar o perfil metabólico dos modelos animais (45). A resposta imune frente à dieta hiperlipídica é também suficiente para causar danos neuronais e à barreira hematoencefálica presente na região da eminência mediana, local de interface do sistema nervoso central com a periferia e próximo de onde se encontram os neurônios que controlam a fome, o Núcleo Arqueado, levando à ruptura do controle da entrada de ácidos graxos e células imunes ao sistema nervoso central (46).

Assim como no hipotálamo, a resposta imune é fundamental no processo de ganho de peso e síndrome metabólica em tecidos como fígado e tecido adiposo (47). A relação entre a infiltração de macrófagos e o aumento da inflamação e da resistência à insulina já foi e ainda é foco de muitos estudos (48, 49). Em 2005, Cinti e colaboradores foram os primeiros a mostrar que na obesidade, macrófagos passam a circundar adipócitos hipertrofiados em estruturas conhecidas como crown-like (50). Muitos autores atribuem ao sistema imune inato, em especial os macrófagos, o gatilho da inflamação nesse tecido com consequências metabólicas importantes (51), inclusive demonstrando que a dieta rica em gordura é a responsável pela mudança de um perfil de macrófagos anti-inflamatórios (M2) para um perfil pró-inflamatório (M1) (52). Em indivíduos obesos ocorre também grande infiltração de macrófagos no tecido adiposo, o que contribui para a produção de citocinas inflamatórias e os prejuízos subsequentes (53). Num primeiro momento, somente as células do sistema imune inato foram encontradas no tecido adiposo; porém, dados recentes demonstram a presença e a participação importante de células da imunidade adaptativa, como os linfócitos T e B, no processo inflamatório do tecido adiposo na obesidade (54). Além do sistema imune inato, a progressão e não resolução do quadro inflamatório desencadeia a segunda linha de defesa, o sistema imune adaptativo. Evidências recentes mostram que esse braço da imunidade não somente participa da inflamação decorrente da obesidade no tecido adiposo, como parece precedê-la. Modelos animais alimentados com HFD (High-Fat Diet, dieta rica em gordura) apresentam um infiltrado de linfócitos T CD8 precedendo a infiltração de macrófagos, inclusive exercendo papel de influenciar no recrutamento, migração e diferenciação destes últimos (55).

O sistema imune adaptativo, também conhecido como imunidade adquirida, é aquele responsável pela resposta mais tardia e mais específica contra os patógenos. Esse sistema é por sua vez dividido em componentes de acordo com as células e as moléculas



características; imunidade humoral e celular. A imunidade humoral é composta principalmente pelos anticorpos que são proteínas solúveis secretadas pelos linfócitos B. Esses anticorpos reconhecem e exercem seus mecanismos efetores sobre moléculas livres. Já os patógenos intracelulares são alvo da resposta por linfócitos T, que reconhecem peptídeos apresentados por moléculas denominadas MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade) de classe I e II. A resposta de linfócitos T pode ser ainda subdividida classicamente em duas. A primeira é representada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (helper ou auxiliares), que reconhecem peptídeos expressos via MHC II, presente em células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs). Uma vez ativos, os linfócitos T CD4 coordenam a resposta imune inata e adaptativa, estimulando a capacidade fagocítica de macrófagos, estimulando a produção de anticorpos pelos linfócitos B entre outras. A segunda é aquela composta pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos), que reconhecem peptídeos expressos pelo MHC I. Este, por sua vez, está expresso em todas as células nucleadas e apresenta qualquer antígeno que esteja no ambiente intracelular, como antígenos próprios, antígenos tumorais ou provenientes de vírus. A resposta do linfócito T CD8 frente a esse reconhecimento é de morte da célula-alvo (56).

Estudos demonstraram que em tecido adiposo de camundongos obesos ocorre um recrutamento de linfócitos T e dentre essa população, as células CD8<sup>+</sup> são as que mais aumentam durante o desenvolvimento da obesidade, enquanto as células CD4<sup>+</sup> e T regulatórias (células T com capacidade de regular negativamente a resposta, com efeito anti-inflamatório) sofrem redução. Desenvolvendo a hipótese, animais em dieta hiperlipídica e ob/ob (animais obesos resultado da ausência da produção de leptina) cujas células T CD8<sup>+</sup> foram depletadas apresentaram reduzida infiltração de macrófagos M1 e expressão de citocinas inflamatórias no tecido adiposo. Além disso, esses animais apresentaram melhora na resistência à insulina. Entretanto, quando células CD8<sup>+</sup> são restituídas, tanto a inflamação quanto a resistência à insulina foram novamente agravadas (54). Ainda em camundongos alimentados com dieta rica em gordura, observa-se no tecido adiposo visceral, um aumento da razão CD8:CD4 e um aumento da relação entre células T com perfil inflamatório (Th1) sobre aquelas com função reguladora, anti-inflamatórias, as células T regulatórias (Tregs) (57). Em humanos, essa razão entre Th1 e Treg dobra no tecido adiposo (58).

No sistema nervoso central, a presença de uma resposta imune adaptativa foi, durante séculos, motivo de controvérsia. Até poucos anos atrás, uma característica que se atribuía ao SNC era a de que se tratava de um tecido imuno-privilegiado, onde haviam células imunes residentes, como astrócitos e micróglia porém, células da periferia não seriam passíveis de recrutamento. De fato, a proteção compreende uma rede complexa de

barreiras ativas e passivas e a modificação da resposta imune para proteger o sistema nervoso central (59). Neste contexto, os astrócitos surgem como responsáveis pela manutenção neuronal, conferindo um microambiente apropriado e contribuindo para a proteção da barreira hematoencefálica (60). Porém, a observação que remonta ao século XIX de que havia vasos linfáticos nessa região confrontava essa idéia (61). Nas décadas de 1940 e 60, outros pesquisadores corroboraram com essa observação, mas acabaram caindo no esquecimento (62, 63). Foi somente com o advento de tecnologias avançadas e técnicas de imunofluorescência e animais geneticamente modificados que se pôde demonstrar de forma indiscutível a presença exuberante de uma rede linfática robusta que circunda o SNC e drena linfa e células imunes do cérebro para a periferia e traz células mielóides no sentido inverso (64). Em 1998, Rapalino e colaboradores observaram que macrófagos da circulação sistêmica promoviam a recuperação de danos na coluna vertebral (65). Além disso, quando essas células periféricas eram impedidas de entrar no SNC, os danos à medula eram agravados, evidenciando um papel protetor de células imunes mielóides no contexto de danos centrais (66).

Se há linfa, há células imunes. Em 1977, Barker e Billingham demonstraram que há naturalmente linfócitos T no sistema nervoso central, mas em quantidades tão pequenas que não podiam ser detectadas pelos métodos de imunohistoquímica da época (67). Da mesma forma, moléculas de MHC, necessárias para a apresentação de antígenos às células T, são expressas constitutivamente em células parenquimais neurais, mas em níveis muito baixos em situações normais (68). Em modelos de inflamação do sistema nervoso central e de doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla, tanto a expressão de MHC como os níveis de linfócitos T aumentam expressivamente no tecido (69). Nessas situações, a entrada de linfócitos T no SNC marca o início da doença (70). No desenvolvimento da doença de Alzheimer, estudos recentes mostram que os pacientes portadores apresentam aumento de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no líquido cefalorraquidiano (71) e aumento significativo do marcador de linfócitos T, CD3, principalmente linfócitos T do tipo CD8 positivos (90%) no parênquima cerebral *post mortem* (72). Há também relação direta entre os linfócitos T e células inatas residentes, como astrócitos. Em condições normais, os astrócitos induzem a apoptose de linfócitos T, protegendo assim o sistema nervoso central do dano que isso poderia ocasionar (73). Sob estímulo inflamatório prolongado *in vivo* ou sob efeito do IFN- $\gamma$  *in vitro*, os astrócitos funcionam como células apresentadoras de antígenos através do MHC de classe II, ativando assim linfócitos da linhagem CD4<sup>+</sup> (74) e promovendo a liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas, atraindo assim mais células imunes (75). Dessa maneira, em situações inflamatórias, os astrócitos não só

atraem os linfócitos como também funcionam como células apresentadoras de antígeno e contribuem para promover a inflamação.

Em um estudo recente, pesquisadores injetaram no ventrículo lateral do cérebro de camundongos, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , citocinas pró-inflamatórias, e observaram, em várias regiões do cérebro, inclusive no hipotálamo, o aumento na expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, como ICAM-1. Além disso, e principalmente no hipotálamo, aumentou a marcação para linfócitos T (76). Durante uma resposta imune mediada por células T, semelhante à encontrada em situações de febre, com aumento de IFN $\gamma$  no cérebro, o aumento de citocinas e células imunes levam a alterações inclusive comportamentais (77). A presença de linfócitos T no cérebro vai, no entanto, além da doença. Essas células estão presentes no sistema nervoso central para manter também o correto funcionamento do órgão. A ausência de células T CD4, do braço Th2 (perfil de inflamação menos exacerbada, crônica, menos inflamatório), leva a distúrbios de aprendizagem e memória nos animais (78).

Até este momento, temos claro que uma resposta imune hipotalâmica é mecanismo chave para o desenvolvimento de resistência a sinais periféricos de saciedade, insulina e leptina, e os ácidos graxos saturados, provenientes da dieta, são capazes de desencadear essa resposta, sistemicamente. Além disso, uma inflamação sustentada, com presença de células do braço adaptativo do sistema imune, representa danos importantes ao sistema nervoso central, evidenciado em doenças neurodegenerativas. Qual seria então o papel de linfócitos T na resposta imune hipotalâmica frente às dietas hiperlipídicas? Até o momento, não há estudos que explorem esta questão.

Os linfócitos T são incapazes de reconhecer moléculas livres, como fazem os anticorpos e os receptores da célula B. Como visto anteriormente, esses linfócitos reconhecem peptídeos apresentados em estruturas chamadas MHC, que são expressas na superfície de todas as células. Os MHCs de classe I e II são muito similares em sua estrutura. São glicoproteínas de membrana que funcionam como apresentadoras de antígenos altamente especializadas em cuja fenda, peptídeos, próprios e patogênicos, são inseridos e apresentados aos TCRs, receptores das células T (79). No entanto, lipídeos próprios e não próprios também são apresentados como antígenos a linfócitos. Como membro da família do MHC de classe I, o CD1 é uma glicoproteína de membrana que apresenta lipídeos a um tipo específico de linfócito T, chamados iNKT (invariant Natural Killer T cell). Esse processo ocorre durante a apresentação antigênica no timo, garantindo a tolerância imunológica a lipídeos próprios (80). Essa molécula é expressa tanto em camundongos como em humanos e encontrada em células da linhagem hematopoiética,

como células B e T e também em células dendríticas (81). O perfil de produção de citocinas das células a partir de reconhecimento do CD1 é tanto inflamatório clássico (Th1), com produção de IFN $\gamma$ , como anti-inflamatório/inflamatório alternativo (Th2), via IL4 (82, 83).

O CD1 tem capacidade de apresentar lipídeos a grupos especializados de células T e os primeiros estudos que avaliaram esta resposta utilizaram a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* como modelo experimental (84). Seu papel vem sendo relacionado a doenças autoimunes como diabetes melitus do tipo 1 e esclerose múltipla (85) e sua maior expressão parece ser no tecido adiposo (86). Nele, a ativação do CD1 exerce papel benéfico, melhorando a tolerância à glicose e levando à perda de peso (87, 88, 89). No sistema nervoso central, a ativação da via do CD1 está relacionada à melhora no quadro de inflamação aguda em modelos experimentais de encefalomielite (90).

Neste trabalho, aventamos a hipótese que CD1 participa da resposta inflamatória no hipotálamo de modelo de obesidade induzida por dieta. Nossos resultados revelam que logo no início do consumo de dieta hiperlipídica há um aumento da resposta imune adaptativa, representada por CD4, CD8 e CD1. Além disso, o estímulo da atividade do CD1 nesse território anatômico evidenciou um papel de potencializador da inflamação e do fenótipo obeso, enquanto sua redução protegeu os animais da intolerância à glicose e do excessivo ganho de peso.

## 2.0 OBJETIVOS

### ***Objetivo Geral***

Caracterizar a presença de linfócitos T e a expressão de CD1 no hipotálamo e investigar os efeitos da imunidade adaptativa na fisiopatologia do hipotálamo em modelo animal de obesidade.

### ***Objetivos Específicos***

- Avaliar o recrutamento de células do sistema imune adaptativo no hipotálamo frente ao consumo de dieta hiperlipídica;
- Avaliar a expressão e localização hipotalâmica de CD1 e sua modulação com a dieta;
- Verificar os efeitos de ganho de peso e tolerância à glicose da inibição de CD1 no hipotálamo;

- Verificar os efeitos de ganho de peso e tolerância à glicose da ativação de CD1 no hipotálamo.

### 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

*Animais.* Para todos os experimentos, machos Swiss adultos (com 5 ou 6 semanas de vida) foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP. Eles foram mantidos no ciclo de claro-escuro por 12h com controle de temperatura e com livre acesso a comida e água. Os animais foram alimentados com dieta padrão (CHOW) adquirida de Nuvilab, São Paulo, Brazil, ou a dieta hiperlipídica (HF), preparada pelo próprio laboratório e certificada como consta na Tabela abaixo (Tab 1). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Unicamp (CEUA-UNICAMP) (3205-1 e 4624-1).

**Tabela 1 – Composição das dietas**

<b>Ingredientes</b>	<b>Controle (g)</b>	<b>Hiperlipídica rica em saturados (g)</b>
Amido	427,5	115,5
Caseína	200,0	200,0
Amido de Milho dextrinizado	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	312,0
Celulose microfibras (fibra)	50,0	50,0
Mistura de minerais	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	10,0	10,0
L-cistina	3	3
Bitartrato de colina	2,5	2,5
<b>Total</b>	<b>1000,0</b>	<b>1000,0</b>

*Cirurgia Estereotáxica.* Com 6 semana de vida, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica. Os animais foram anestesiados com Xylazina (10mg/kg-IP) e Ketamina (100mg/kg-IP). Seguindo as coordenadas de Paxinos-Watson (1980) (lateral, 0,0mm; antero-posterior, 0,0mm e profundidade, 4,5mm), 2uL de CD1

(20ng) ou alphaGalCer (10ng) e seus respectivos controles foram injetados em dose única no terceiro ventrículo hipotalâmico.

*Teste de Tolerância a Glicose (GTT):* Os níveis de glicose no sangue foram determinados usando um glicosímetro da Abbott (Opptimum, Abbott Diabetes Care, Inc., Alameda, CA, USA). Após um jejum de 12h (overnight), os animais foram realimentados por 15 minutos e então deixados em jejum por 4 horas. A primeira amostra de sangue foi coletada (tempo 0) e após, 20% de glicose (2g/kg) foi administrada intraperitonealmente. Amostras de sangue provenientes da cauda foram coletadas em diferentes tempos para determinação da concentração de glicose.

*Extração dos Tecidos.* Após um jejum de 12h (overnight), os animais foram realimentados por 15 minutos e então deixados em jejum por 4 horas antes da eutanásia. Eles foram anestesiados com lidocaína (1mg/kg-IP) e depois thiopental (100mg/kg-IP). O crâniofoi aberto e o hipotálamofoicoletado.

*Extração de RNA e PCR em Tempo Real:* As amostras foram homogeneizadas em reagente de TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por 30s usando um homogeneizador de tecidos (Polytron-Aggregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland) na velocidade máxima. Em seguida foram centrifugadas a 6.000 x g, e o conteúdo total de RNA foi isolado de acordo com as instruções do fabricante e quantificado através de espectrometria (nanodrop) Gen5. A síntese de cDNAfoi realizada com 3ug do total de RNA usando o Hight-CapacitycDNA Reverse Transcription Kit (AppliedBiosystems).A expressão gênica foi analisada através de PCR em Tempo Real usando o sistema de array gênico PCR Array (SABioscience). Os dados foram analisados usando o sistema PCR Array Data Analysis Software (Excel & Web based) (SABioscience). Alíquotas de 3,0 ng de RNA foram submetidas à transcrição reversa utilizando-se primers hexaméricos randômicos e SuperscritMaloney MLV transcriptase reversa. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan TM (AppliedBiosystems), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene GAPDH (TaqManTM - AppliedBiosystems) foi o controle endógeno da reação. Os

valores da expressão gênica foram obtidos pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (AppliedBiosystems).

*Western Blot.* Os extratos totais protéicos foram ressuspensos em tampão de Laemmli e as amostras aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (gel não desnaturante). A transferência em membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) foi feita utilizando TransBlot SD Semi-Dry TransferCell (Bio-Rad) por 1 hora a 15V (constante) em tampão contendo metanol e SDS. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 12 a 14 horas com um anticorpo específico. A ligação do anticorpo às proteínas não específicas foi minimizada pela pré-incubação das membranas de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5 % de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 0,02 % de Tween 20) por 1 hora. As membranas foram posteriormente incubadas com anticorpo secundário (diluído 1:5000 em TTBS contendo 3% de leite em pó) por 1,5 hora a temperatura ambiente. Após incubação, utilizou-se uma solução quimioluminescente (SuperSignal West Pico; Pierce) e detectado por Fotodocumentador ImageQuant LAS 4000; a intensidade das bandas foram quantificadas por densitometria óptica (UN-Scan-it Gel 6.1, Orem, Utah, USA).

*Imunofluorescência.* Os camundongos foram mantidos em jejum de 12h (overnight) realimentados por 15 minutos e então deixados em jejum por 4 horas, anestesiados com Ketamina (100mg/kg) e xylazina (10mg/kg) e perfundidos com salina e 4% de paraformaldeído (PFA). O cérebro foi completamente removido e deixado em solução de 4% PFA por 24 horas, seguido por 48 horas em uma solução de sacarose 30%. Seções coronais na espessura de 20µm foram feitas utilizando-se o criostato (LEICA Microsystems, CM1860, Buffalo Grove, IL, USA). Esses cortes foram lavados com PBS 1x e bloqueados com uma solução contendo 5% de soro e 0,2% Tween no tampão fosfato por 1 hora em temperatura ambiente seguida de incubação overnight a 4°C com anticorpos específicos numa solução de bloqueio (1% de albumina em PBS-Tween). Os cortes foram posteriormente incubados por 2 horas em anticorpos secundários. A marcação do núcleo foi feita utilizando-se TO-PRO®-3 Iodide ((642/661) T3605, 1:1000, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) em PBS. As análises foram feitas utilizando microscopia confocal (Leica TCS SP5 II).

*Imagens Termográficas.* A temperatura interscapular dos animais foi medida utilizando-se a câmera termográfica ThermovisorFlir T430SC – INCL WiFi (T6201).

*Respirometria Indireta:* Camundongos Swiss, submetidos aos tratamentos previamente descritos, foram aclimatados por 24 horas e posteriormente analisados por 48 horas quanto ao consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) e liberação de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), bem como o gasto energético (kcal/dia/kg), utilizando-se o Respirômetro Oxylet M3 system; PanLab/Harvard Apparatus.

*Bioinformática:* Foram feitas análises de correlação com dados referentes ao RNAm de hipotálamo (INIA Hypothalamus AffyMoGene 1.0 ST [Nov10]0 e fenótipos (BXD Published Phenotypes) das famílias BXD de camundongos isogênicos como publicado anteriormente (96), os quais estão disponíveis no banco de dados GeneNetwork ([www.genenetwork.org](http://www.genenetwork.org)). Os *heat maps* foram elaborados usando-se GENE-E software (The Broad Institute, [www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/](http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/)).

*Análise Estatística.* Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão (SEM). Para comparar 2 grupos independentes, nós utilizamos o teste t de Student's e para comparar 3 ou mais grupos, utilizamos ANOVA, com Tukey como teste post hoc. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$  e os dados foram analisados e representado utilizando-se o GraphPadPrism®.



## 4.0 RESULTADOS – ARTIGO

### CD1 is involved in diet-induced hypothalamic inflammation in obesity

Bruna Bombassaro<sup>1</sup>, Albina F. S. Ramalho<sup>1</sup>, Milena Fioravante<sup>1</sup>, Carina Solon<sup>1</sup>, Guilherme Nogueira<sup>1</sup>, Rodrigo S. Gaspar<sup>2</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>2</sup>, Licio A. Velloso<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13084-970, Brazil*

*<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Biology of Exercise, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil*

The Laboratory of Cell Signaling belongs to the National Institute of Science and Technology – Neuroimmunomodulation (INCT-NIM)

Corresponding Author:

Lício A. Velloso

Laboratory of Cell Signaling, Obesity and Comorbidities Research Center

University of Campinas,

Campinas, SP, Brazil

Email: lavelloso.unicamp@gmail.com

Key words: inflammation/hypothalamus/innate/adaptive/lymphocyte

Running title: Hypothalamic CD1 in obesity

Number of figures: 7

## Highlights

- T-lymphocytes increase in the hypothalamus of rodents fed a high-fat diet
- CD1 expression is increased in the hypothalamus in an experimental model of obesity
- Inhibition of hypothalamic CD1 rescues mice from diet-induced obesity
- Activation of CD1-dependent signaling increases body mass gain and worsen

**Abstract**

Obesity-associated hypothalamic inflammation plays an important role in the development of defective neuronal control of whole body energy balance. Because dietary fats are the main triggers of hypothalamic inflammation, we hypothesized that CD1, a lipid-presenting protein, may be involved in the hypothalamic inflammatory response in obesity. Here, we show that early after the introduction of a high-fat diet, CD1 expressing cells, which are mostly present in the median eminence/arcuate nucleus transition zone, spread rapidly towards the mediobasal hypothalamus. The inhibition of hypothalamic CD1 reduces diet-induced hypothalamic inflammation and rescues the obese and glucose-intolerance phenotype of mice fed a high-fat diet. Conversely, the chemical activation of hypothalamic CD1 further increases diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. A bioinformatics analysis revealed that hypothalamic CD1 correlates with transcripts encoding for proteins known to be involved in diet-induced hypothalamic abnormalities in obesity. Thus, CD1 is involved in at least part of the hypothalamic inflammatory response in diet-induced obesity and its modulation affects the body mass phenotype of mice.

## Introduction

Obesity is one of the most prevalent human health problems in the world (Collaborators et al., 2017). Despite recent pharmacological advance that results in more efficient treatment (Apovian et al., 2015; Pi-Sunyer et al., 2015; Wadden et al., 2013) recurrence is high and affects most patients undergoing behavioral, pharmacological, and even surgical approaches to treat obesity (Sumithran et al., 2011). Experimental and human studies have provided cellular and anatomical foundations to explain why, during the course of obesity, subjects fail to maintain body mass stability following body-mass reduction programs (Cornier, 2011; Thaler et al., 2012; van de Sande-Lee et al., 2011; Wadden et al., 2013). In short, dietary fats trigger a TLR4- and endoplasmic reticulum stress-dependent inflammatory response in the hypothalamus leading to neuronal damage (Cavadas et al., 2016; Cnop et al., 2012; Gregor and Hotamisligil, 2011). The affected neurons can no longer respond properly to nutrient and hormonal signals to maintain whole body energy homeostasis (Cavadas et al., 2016; Morton et al., 2014; Muller et al., 2016). This generates a positive-energy balance status that promotes body mass gain and hinders any attempts to maintain and stabilize body mass following approaches aimed at reducing body adiposity (Wadden et al., 2013).

As illustrated by a number of experimental studies, the inhibition of different components of the inflammatory machinery active in the hypothalamus of obese rodents contributes, at least in part, to the prevention or treatment of obesity (De Souza et al., 2005; Fioravante et al., 2017; Milanski et al., 2009; Ozcan et al., 2009; Zhang et al., 2008). These findings indicate hypothalamic inflammation is an important target for the treatment of obesity, and defining the particularities of this process may help in the development of new therapeutic strategies. To date, only components of the classical innate immune response have been identified as playing a role in diet-induced hypothalamic inflammation (De Souza et al., 2005; Fioravante et al., 2017; Milanski et al., 2009; Morari et al., 2014; Ozcan et al., 2009; Rahman et al., 2018; Valdearcos et al., 2017; Zhang et al., 2008). However, considering the chronicity of this inflammatory activity and the broad spectrum of damage that is inflicted to the hypothalamus during the course of

obesity (De Souza et al., 2005; Fioravante et al., 2017; Milanski et al., 2009; Ozcan et al., 2009; Zhang et al., 2008) it is possible that other components of the immune system are also involved in the process. It is currently known that components of the adaptive immune system play important roles in other brain inflammatory diseases (Bailey-Bucktrout et al., 2013; Herz et al., 2011; Xu et al., 2010). In fact, a recent study has provided undisputed proof of the existence of a fully functional lymphatic system in the brain (Louveau et al., 2015), reinforcing the concept that adaptive response might be more common in brain conditions than previously suspected. Here, we explored the hypothesis that CD1, an MHC-like T-lymphocyte presenting molecule, could be involved in the diet-induced inflammatory activity of the hypothalamus in an experimental model of obesity.

Here, we show that during the early stages of diet-induced obesity, the expression of T-lymphocyte co-receptors, CD4 and CD8; as well as CD1 are increased in the hypothalamus. The inhibition of CD1 protects against body mass gain and glucose intolerance, whereas its activation exacerbates the obese phenotype, increases markers of hypothalamic inflammation, and transforms obesity resistance in obese-prone mice.

## **Material and Methods**

### **Experimental models**

For all experiments, aged-matched, 6-week-old Swiss mice were purchased from the animal facility of the University of Campinas. Mice were maintained on a 12-h light-dark cycle in a temperature-controlled facility with free access to food and water. Mice were fed regular chow diet (Nuvilab, São Paulo, Brazil) or a HFD, which was produced in our own experimental nutrition facility (Suppl. Table 1). Experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Campinas (3205-1 and 4624-1).

### **Stereotaxic surgery**

Mice were submitted to hypothalamic third ventricle stereotaxic cannulation under xylazine (10 mg/kg, IP) and ketamine (100 mg/kg, IP) anesthesia. The coordinates were as follows: lateral, 0.0 mm; antero-posterior, 0.0 mm; and depth, 4.5 mm. After evaluation of the proper function and location of the cannula, mice were injected with a 2  $\mu$ L single dose of CD1 antibody (20 ng, adapted from (Milanski et al., 2009)), alpha-galactosylceramide (alphaGalCer) (10 ng, adapted from (Lynch et al., 2016)), or respective vehicles.

### **Intraperitoneal glucose tolerance test**

Blood glucose was determined using a glucometer (Opptimum, Abbott Diabetes Care, Inc., Alameda, CA, USA). After an overnight fast, mice were re-fed for 15 min and fasted again for 4 h. The first blood sample was collected (time 0), and 20% glucose (2.0 g/kg body weight) was administered via intraperitoneal injection. Blood samples from the tails were collected for the determination of glucose concentration.

### **Insulin tolerance test (ITT)**

The ITT was performed in 4-h fasted mice. Tail vein blood was collected immediately before the intraperitoneal injection of insulin (1.5 IU/kg body mass) and after 5, 10, 15 and 20 minutes. Glucose was determined using a portable glucose meter (Optium Xceed - Abbott®). Thereafter, the area under the curve (AUC) for glucose and the constant for glucose decay during the ITT (kITT) were calculated.

### **Tissue extraction**

Mice were fasted for 12 h, re-fed for 15 min, and fasted again for 4 h before euthanasia. Mice were anesthetized with a dose of lidocaine (1 mg/kg, IP) followed by a lethal dose of thiopental (100 mg/kg, IP). The skull was opened and the hypothalamus was carefully removed.

## **Immunoblotting**

Hypothalami were homogenized using a tissue homogenizer (Polytron-Aggregate, Kinematica, Littau/Luzern, Switzerland) at maximum speed in an anti-protease cocktail (10 mmol/L imidazole, pH 8.0, 4 mmol/L EDTA, 1 mmol/Laprotinin, 2.5 mg/L leupeptin, 30 mg/L trypsin inhibitor, 200  $\mu$ mol/L DTT, and 200  $\mu$ mol/L phenylmethylsulfonyl fluoride). After sonication, an aliquot of the extracts was collected and the total protein content was determined using the dye-binding protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Samples containing 100 $\mu$ g of protein were incubated for 5 min at 95°C with 4 $\times$ Laemmli sample buffer (1 mmol sodium phosphate/L, pH 7.8, 0.1% bromophenol blue, 50% glycerol, 10% SDS, and 2% mercaptoethanol). Electrotransfer of proteins to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) was performed in a Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) for 1 h at 15V (constant) in buffer containing methanol and SDS. Following transfer, the membranes were blocked with 5% skim milk in Tween/Tris-buffered saline (10 mmolTris/L, 150 mmolNaCl/L, and 0.5% Tween 20) for 1 h at room temperature and the membranes were incubated with the target protein antibodies overnight at 4°C.

## **Immunofluorescence**

Six-week-old male Swiss mice fed chow or a HFD were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) perfused with saline and 4% paraformaldehyde. The brain was removed and kept in a 4% paraformaldehyde solution for 24 h, followed by 48 h in a 30% sucrose solution for cryoprotection. Coronal sectioning at a thickness of 20  $\mu$ m was performed using a cryostat (LEICA Microsystems, CM1860, Buffalo Grove, IL, USA). Sections were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and blocked in a solution containing 5% normal serum and 0.2% Tween in PBS for 1h at room temperature followed by incubation at 4°C overnight with the specif antibodies in blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS-Tween). Next, sections were incubated for 2 h with goat anti-rabbit FITC secondary antibody (sc2012). Nuclear staining was obtained using TO-PRO®-3 Iodide (642/661) T3605 (1:1000;

Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in PBS. Analysis and documentation of the results were performed using a Leica TCS SP5 II confocal fluorescence microscope.

### **RNA extraction and real-time qPCR**

The samples were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil) in a tissue homogenizer (Polytron-Aggregate, Kinematica) at maximum speed. The total RNA content was isolated according to the manufacturer's instructions, quantified, and analyzed by spectrophotometry (NanoDrop 8000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The quantity and integrity of RNA were assessed by Nanodrop (Nanodrop 8000, ThermoFisher Scientific). cDNA synthesis was performed with 3 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). The TaqMan System was used in association with real-time PCR to detect target genes (Suppl. Table 2).

### **Thermic images**

The interscapular temperatures of the mice were measured using the ThermovisorFlir T430SC – INCL WiFi (T6201) according to the recommendations of the manufacturer.

### **Indirect Respirometry**

Swiss mice, submitted to the previous described experiments, were kept for 24 hours to acclimate and then 48 hours to analyze oxygen consumption, carbonic gas release and energy expenditure (kcal/day/kg) in the Respirometer Oxylet M3 system; PanLab/Harvard Apparatus.

### **Bioinformatics analysis**

Analysis of correlation was performed with data on hypothalamic mRNA (INIA Hypothalamus AffyMoGene 1.0 ST [Nov10]) and phenotypes (BXD Published Phenotypes) from families of BXD inbred mice as previously published (Andreux et al., 2012), which are all accessible on GeneNetwork ([www.genenetwork.org](http://www.genenetwork.org)). Heat maps were created using GENE-E software (The Broad Institute, [www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/](http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/)).



## Statistical analysis

Results are presented as the mean  $\pm$  standard error. To compare means between two groups, we used the Student's *t*-test for independent samples and to compare three or more groups, we used analysis of variance with Tukey's *post hoc* test. The significance level adopted was  $p < 0.05$  and Graph Pad Prism was used to analyze the data.

## Results

### Increased expression of CD4, CD8, and inducible T-cell co-stimulator (ICOS) in the hypothalamus of mice fed a high-fat diet (HFD)

Studies have shown that innate inflammatory cytokines and chemokines are increased in the hypothalamus of mice as early as one day following the introduction of a HFD (Morari et al., 2014; Thaler et al., 2012). Here, we used real-time polymerase chain reaction (PCR), immunoblotting, flow cytometry, and confocal microscopy to evaluate the presence of markers of adaptive immunity in the hypothalamus of mice fed a HFD (Fig. 1A–1F). Hypothalamic CD4 transcripts were increased 10 days after the introduction of a HFD (Fig. 1A); however, CD4 protein (Fig. 1B) were not significantly affected by the dietary intervention. CD8 transcripts increased after three and 10 days of dietary intervention (Fig. 1A); this was accompanied by increased CD8 protein expression (Fig. 1C) on day three following the introduction of a HFD. In addition to the increase in expression of lymphocytes markers, the consumption of a HFD resulted in the increased transcript (Fig. 1A) and protein levels (Fig. 1D) of ICOS, an inducible co-stimulator that increases following the engagements of CD4, CD8, or CD28 (Hutloff et al., 1999). Confocal microscopy revealed that CD4- and CD8-expressing cells were present in the limits between the arcuate nucleus and the median eminence (ME) as early as one day after the introduction of a HFD (Fig. 1E and 1F, HF1d). Three days after the introduction of a HFD, CD8 cells could still be observed in the limits between the arcuate nucleus and the ME (Fig. 1F,

HF3d). Ten days after the introduction of a HFD, CD4- and CD8-expressing cells were concentrated within the medial area of the arcuate nucleus (Fig. 1E and 1F, HF10d).

**The amount of dietary fat consumed, rather than the genetic predisposition, determines the increased expression of T-lymphocyte markers in the hypothalamus of mice fed a HFD**

Swiss mice belong to an outbred strain genetically related to the diabetes-prone AKR (Clee and Attie, 2007). Following consumption of a HFD, Swiss mice gain weight according to a normal distribution, as illustrated in Figure 2A (detailed protocol was published elsewhere (Souza et al., 2016)). As in human populations and other strains of outbred rodents, the distinct body mass phenotypes of Swiss mice fed a HFD are primarily due to genetic factors (Irani et al., 2007; Souza et al., 2016). The most important aspect leading to increased body mass gain in OP compared with OR mice is the amount of calories consumed (Fig. 2B) (also evaluated in (Souza et al., 2016)), which results in an up to 10% increase in body mass after a period of 10 days on a HFD (Fig. 2C). The expression of CD4 (days 1, 3, and 10; Fig. 2D), CD8 (days 1 and 3; Fig. 2E), and ICOS (days 1 and 3; Fig. 2F) are increased in the hypothalamus of OP compared with OR mice. To evaluate if the differences in the expression of T-lymphocyte markers were simply due to the consumption of a HFD or to the amount of HFD consumed, we performed a pair-feeding experiment offering OP mice the same amount of diet consumed by OR mice (Fig. 2G). Pair-feeding resulted in a similar body mass gain in OP and OR mice (Fig. 2H), which was accompanied by similar hypothalamic transcript levels of CD4 (Fig. 2I), CD8 (Fig. 2J), and ICOS (Fig. 2K). Thus, the expression of T-lymphocyte markers in the hypothalamus of Swiss mice fed a HFD is mostly due to the amount of diet consumed, rather than genetic particularities that distinguish mice that display divergent body mass phenotypes. Because dietary fats play a central role in the development of diet-induced hypothalamic inflammation, we asked if CD1, a molecule that presents different types of lipids to T-lymphocytes and iNKTs could be involved in the regulation of inflammatory activity in the hypothalamus of mice fed a HFD.

### **Inhibition of hypothalamic CD1 reduces the innate and adaptive responses in the hypothalamus of mice fed a HFD**

In Swiss mice not separated by differences in obesity propensity, there was an increasing trend in the expression of the hypothalamic transcript of CD1 one day after the introduction of a HFD (Fig. 3A). When mice were separated into OP and OR groups, there was a trend to increase CD1 in the hypothalamus of OP mice three days after the introduction of a HFD (Fig. 3B) and this trend was lost with pair-feeding (Fig. 3C). Next, we evaluated the impact of a HFD on the distribution of CD1-positive cells in the hypothalamus of mice. As shown in Figure 3D, in mice fed chow, most CD1-positive cells were present in the region that limits the ME and the arcuate nucleus (Fig. 3D, CHOW). One day after the introduction of a HFD, CD1-positive cells were detected in the ventral part of the arcuate nucleus (Fig. 3D, HF1d); and after three days, CD1-positive cells were detected throughout most of the arcuate nucleus (Fig. 3D, HF3d). After 10 days on a HFD, the distribution of CD1-positive cells in the mediobasal hypothalamus was again similar to that seen in mice fed chow (Fig. 3D, HF10d). In addition, in the neuronal cell line (CLU) the expression of CD1 was greater than in the microglia lineage (BV2) and also than in the whole hypothalamus of mice (Fig. 3E). To test the hypothesis that CD1 could be involved in the diet-induced hypothalamic abnormalities that occur in obesity, we immune-depleted hypothalamic CD1 using a specific antibody. As shown in Figure 3F, the hypothalamic injection of an anti-CD1 antibody resulted in a 60% reduction of CD1 protein. This was accompanied by reduced expression of ICOS (Fig. 3G), CD4 (Fig. 3H), CD8 (Fig. 3I), and Th1 cytokines (Fig. 3J–3M), particularly interleukin IL-1 $\beta$  (Fig. 3K). Also, we can see a reduction in IL-6 expression (Fig. 3L). Conversely, interferon-gamma (Suppl. Fig. 1A) and IL-4 (Suppl. Fig. 1B), underwent an increase ten days after the inhibition of hypothalamic CD1.

### **Inhibition of hypothalamic CD1 reduces body mass gain and whole body glucose intolerance**

The immunoneutralization of CD1 in the hypothalamus of mice fed a HFD resulted in a 50% reduction of body mass gain after 10 days (Fig. 4A and 4B). This was not accompanied by

changes in caloric intake (Fig. 4C), and whole body energy expenditure adjusted for body mass (Fig. 4D); however, it was accompanied by increased interscapular temperature (Fig. 4E) and reduction in the hypothalamic expression of NPY (Fig. 4F) without modification of POMC (Fig. 4G). In addition, the hypothalamic CD1 immunoneutralization resulted in improvement of whole body glucose tolerance (Fig. 4H and 4I) and fasting blood glucose (Fig. 4J). This was accompanied by reduced blood insulin (Fig. 4K) and improved whole-body insulin sensitivity (Fig. 4L-4M). The inhibition of hypothalamic CD8 was not accompanied by changes in body mass and glucose tolerance (Suppl. Fig. 2A-2C). However, the inhibition of hypothalamic VLA4 was accompanied by a reduction of body mass without changes in glucose tolerance (Suppl. Fig. 2A-2C).

### **Activation of hypothalamic CD1 increases body mass gain and exacerbates diet-induced hypothalamic inflammation**

AlphaGalCer is a widely employed lipid antigen that activates CD1 signaling towards invariant NKTs (iNKTs) (Matsuda et al., 2000). Upon intracerebroventricular (icv) injection, alphaGalCer promoted an increase of body mass gain (Fig. 5A and 5B), which was accompanied by increased caloric intake (Fig. 5C), a trend to reduce interscapular temperature (Fig. 5D) and a reduction of brown adipose tissue expression of uncoupling protein-1 (UCP1) (Fig. 5E) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha (PGC1 $\alpha$ ) (Fig. 5F). Moreover, icv alphaGalCer resulted in glucose intolerance (Fig. 5G) and increased blood insulin levels (Fig. 5H). As shown in Figure 2, the amount of diet consumed, rather than genetics, determines the different phenotypes of OP and OR mice with respect to the presence of markers of the adaptive immune response in the hypothalamus. Therefore, we asked if the lack of obesity predisposition of OR mice could be modified by icv injection of alphaGalCer. As shown in Figure 5I, icv alphaGalCer abolished the obesity resistance phenotype of OR mice, which was due, at least in part, to increased caloric intake (Fig. 5J). Next, we evaluated the impact of icv alphaGalCer in markers of hypothalamic inflammation. As depicted in Figure 6, the treatment with alphaGalCer was accompanied by increased hypothalamic expression of CD1 (Fig. 6A), ICOS (Fig. 6B), CD4

(Fig. 6C), and CD8 (Fig. 6D), indicating that in HFD-fed mice, enhancement of CD1-dependent signaling is capable of further increasing adaptive immune activity in the hypothalamus. Moreover, alphaGalCer icv injection also increased the expression of cytokines of the innate immune response, tumor necrosis factor- $\alpha$  (Fig. 6E) and IL-1 $\beta$  (Fig. 6F), but not the anti-inflammatory cytokines, IL-6 (Fig. 6G) and IL-10 (Fig. 6H). It has been reported that systemic injection of alphaGalCer results in beneficial metabolic outcomes (Lynch et al., 2016); thus, we performed an additional set of experiments as an attempt to reproduce the findings of Lynch et al. (Lynch et al., 2016). As depicted in Supplementary Figure 3A and 3B, systemic injection of alphaGalCer resulted in body mass reduction, which was accompanied by increased brown adipose tissue and interscapular temperature (Suppl. Fig. 4A–4C).

### **Bioinformatics analysis of hypothalamic CD1 transcripts provides evidence of direct association with transcripts encoding for proteins involved in obesity-associated hypothalamic abnormalities**

To determine the potential correlation between CD1 in the hypothalamus and the hypothalamic transcripts encoding for proteins involved in obesity-associated hypothalamic dysfunction, we performed bioinformatics analysis employing a dataset of hypothalamic transcripts from distinct mice strains (Andreux et al., 2012). As depicted in Figure 7A, there is great variability in the level of hypothalamic CD1 transcripts across BXD mice families. In the first round of analysis, we evaluated clusters of transcripts encoding proteins involved in proteostasis, autophagy, and mitochondria function and dynamics, because all of these functions are known to be affected in the hypothalamus in obesity (Cavadas et al., 2016). From the functional clusters we selected the transcripts undergoing the strongest correlation (direct or inverse) with CD1. As depicted in Figures 7B and 7C, 26S proteasome subunit non-ATPase 4 (Psm4), autophagy-related 3 (Atg3), hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit inhibitor (Hif1an), and the mitochondrial inner membrane protein dehydrogenase member 1 (Dhrs1) were strongly correlated with hypothalamic CD1. In the hippocampus, none of these transcripts correlated

with hypothalamic CD1; instead, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9 (Map3k9) was the transcript with the strongest correlation with hypothalamic CD1.

## **Discussion**

To date, no study has evaluated the presence and roles of T lymphocytes in the hypothalamus of obese rodents. Instead, studies have focused on the potential involvement of microglia and astrocytes in the inflammatory process triggered by the consumption of dietary fats (Fuente-Martin et al., 2012; Garcia-Caceres et al., 2012; Le Thuc et al., 2017). Studies have shown that shortly after the introduction of a HFD, resident microglia display both molecular and structural features of activation (Douglass et al., 2017; Valdearcos et al., 2014); however, after a few days they move from the region that limits the arcuate nucleus and the ME and bone marrow-derived monocytes move in to repopulate the arcuate nucleus with new microglia (Morari et al., 2014; Valdearcos et al., 2017). As a circumventricular organ, the ME has a special type of blood/spinal fluid interface (SFI) that provides some degree of permissiveness to nutrients and other substances present in the blood (Mullier et al., 2010). It has been shown that consumption of a HFD leads to early structural and functional damage of the ME-SFI, which may explain why the hypothalamus is the main brain region affected by the consumption of large amounts of dietary fats (Ramalho et al., 2018). This may also help explain how inflammatory cells migrate from the systemic circulation to the mediobasal hypothalamus to expand the inflammatory response triggered by dietary fats. With these concepts in mind, in the present study we evaluated the presence and the putative diet-induced changes in the expression of molecules that belong to the adaptive immune system or act as link between the innate and adaptive responses.

In the first part of the study we showed that CD4, CD8, and ICOS undergo a rapid increase in the hypothalamus of mice fed a HFD. By segregating mice by obesity predisposition and submitting them to pair feeding, we showed that most of the effect of the diet to induce the increase of CD4, CD8, and ICOS was due to the amount of HFD consumed and not genetic predisposition. Therefore, we hypothesized that excessive dietary fats could be acting as antigens to induce the inflammatory activity in the hypothalamus and CD1 could be involved in the process.

CD1 is a  $\beta$ 2-microglobulin associated membrane protein that presents different types of self and foreign lipids to T cells and natural killer cells (NKTs) (Pereira and Macedo, 2016; Salio et al., 2014; Venkataswamy and Porcelli, 2010). Few studies have evaluated the involvement of CD1 in obesity-associated metabolic conditions; CD1 is highly expressed in adipose tissue and its activation protects against diet-induced obesity by a mechanism dependent on the activation of iNKTs with an anti-inflammatory phenotype (Lynch et al., 2016; Lynch et al., 2015; Lynch et al., 2012; Satoh et al., 2016). However, the putative involvement of CD1 in hypothalamic inflammation in obesity is currently unknown. In other regions of the brain, CD1 has been reported to protect against autoimmune encephalomyelitis due to its ability to regulate autoimmune T-cell activation (Teige et al., 2004) and its presence in demyelinated areas of a genetically determined rare form of adrenomyeloneuropathy (Ito et al., 2001).

A number of studies have shown that approaches used to inhibit different components of the innate immune response in the hypothalamus were effective in reverting or attenuating the obesity-associated phenotype of mice (De Souza et al., 2005; Fioravante et al., 2017; Milanski et al., 2009; Ozcan et al., 2009; Zhang et al., 2008). Therefore, we decided to evaluate the impact of inhibiting hypothalamic CD1 on the metabolic and obesity phenotype of mice fed a HFD.

The immunoneutralization of CD1 resulted in reduction of hypothalamic inflammation, which was accompanied by reduced body mass gain and improved glucose tolerance. The resulting phenotype recapitulated the inhibition of a number of other components of the innate immune system (De Souza et al., 2005; Fioravante et al., 2017; Milanski et al., 2009; Ozcan et al., 2009; Zhang et al., 2008); however, it could not be reproduced by the inhibition of hypothalamic CD8

and only partially reproduced by the inhibition of hypothalamic VLA4, which is an integrin expressed in T-lymphocytes and NKTs (Imai et al., 2010). It has been shown that VLA4 is important for the recruitment of lymphocytes to the central nervous system, and its inhibition protects against multiple sclerosis (Gross et al., 2016; Lin and Castro, 1998). In other studies that targeted different components of the obesity-associated hypothalamic inflammation machinery, reduction of body mass and improvement of glucose intolerance were also described (Morari et al., 2014; Ramalho et al., 2018; Thaler et al., 2012). These effects were attributed to a number of different mechanisms, including, in the case of body mass reduction, reduction in caloric intake, increased energy expenditure, and increased spontaneous physical activity (Fioravante et al., 2017; Milanski et al., 2009; Zhang et al., 2008) whereas in the case of improved glucose tolerance, reduced hepatic glucose output, improved insulin secretion, and improved systemic insulin sensitivity (Araujo et al., 2014; Arruda et al., 2011; Milanski et al., 2012; Yan et al., 2014). Here, we did not explore the details of the mechanisms leading to changes in metabolic phenotype, because the primary objective of the study was to explore the potential involvement of CD1 in diet-induced hypothalamic inflammation. Therefore, we hypothesized that if CD1 is indeed important for diet-induced hypothalamic inflammation, increasing its activity should lead to a worsening of the obesity phenotype and an increase in both the innate and adaptive immune responses in the hypothalamus.

In order to induce CD1 signaling towards NKT we employed a pharmacological approach injecting the lipid antigen alphaGalCer in the hypothalamus. There is no previous report of the injection of alphaGalCer in the hypothalamus or in any other region of the brain. There are two studies showing that systemic injection of alphaGalCer can modify brain abnormalities triggered by stroke (Wang et al., 2016; Wong et al., 2011), which suggests that CD1-dependent activation of iNKTs can play a role in brain pathology. Some studies have also employed systemic alphaGalCer to evaluate the role of adipose tissue iNKTs in metabolic disease (Lynch et al., 2016; Lynch et al., 2015; Lynch et al., 2012). It has been shown that in leanness, a specific subset of regulatory iNKTs are present in adipose tissue and provide anti-inflammatory signals due to a



unique transcriptional program (Lynch et al., 2015). The induction of obesity is accompanied by a reduction of this subset of adipose tissue iNKTs, which contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation (Lynch et al., 2012). When obese mice are treated systemically with alphaGalCer, body fat and systemic inflammation are reduced and insulin sensitivity is improved (Lynch et al., 2012). Here, by injecting alphaGalCer systemically, we reproduced the findings of Lynch and coworkers (Lynch et al., 2016; Lynch et al., 2015; Lynch et al., 2012). However, upon icv injection, alphaGalCer produced the opposite metabolic result accompanied by an increase in diet-induced hypothalamic inflammation. As shown by Lynch et al., iNKTs of adipose tissue provide an anti-inflammatory protection against metabolic abnormalities because of their unique transcriptional program that engages E4BR4 instead of PLZF, which is a hallmark transcription factor of the majority of NKT lineages (Kovalovsky et al., 2008; Lynch et al., 2015). Although we have not addressed this, we believe that iNKTs in the hypothalamus are pro-inflammatory, like most reported iNKTs (Cohen et al., 2009; Kovalovsky et al., 2008; Savage et al., 2008), and thus inhibition of its activation results in beneficial metabolic outcomes regulated by the hypothalamus.

In the final part of the study, we employed bioinformatics to ask if hypothalamic CD1 correlated with markers of obesity-associated hypothalamic abnormality. Strongest positive correlation was found for transcripts encoding proteins involved in the ubiquitin/proteasome system, *Psmd4* and *Atg3*, and one transcription factor known to regulate POMC expression, *Hif1an*; whereas strongest negative correlation was found for a transcript encoding a protein involved in mitochondrial function, *Dhrs1*. *Psmd4* is a non-ATPase subunit of the 26S proteasome involved in the identification of proteasome substrates (Huber et al., 2009). In diet-induced obesity, the proteasome undergoes a two-phase regulation, presenting increased activity shortly after introduction of a HFD and reducing as obesity becomes chronic (Ignacio-Souza et al., 2014). *Atg3* encodes a ubiquitin-like conjugating enzyme and is a component of the ubiquitination-like process that occurs during autophagy. A number of studies have shown that neuronal autophagy is affected in the hypothalamus of animal models of obesity, which

contributes to neuronal dysfunction in the regulation of feeding and energy expenditure (Meng and Cai, 2011; Oh et al., 2016; Portovedo et al., 2015). *Hif1an* encodes for one of the subunits of the transcription factor HIF1, which is known to be expressed in proopiomelanocortin (POMC) neurons, which respond to oscillations of systemic nutrients, particularly glucose, and control food intake (Zhang et al., 2011). *Dhrs1* encodes for an inner mitochondrial membrane dehydrogenase. Recent studies have presented strong evidence of functional and structural abnormalities of mitochondria both in AgRP and POMC hypothalamic neurons (Dietrich et al., 2013; Koch et al., 2015; Schneeberger et al., 2013). Thus, the bioinformatics analysis provided an additional layer of support for the involvement of CD1 in hypothalamic dysfunction in obesity.

## **Conclusion**

This is the first study showing that components of the adaptive immune system are involved in hypothalamic inflammation and dysfunction in diet-induced obesity. Considering that dietary fats are important environmental triggers of this process, CD1 emerges as a new potential target for therapeutic approaches to prevent or treat obesity.

## **Abbreviations**

AgRP – Agouti-related protein

AlphaGalCer – Alpha-galactosylceramide

Atg3 – Autophagy-related 3

AUC – Area under the curve

CD1 – Cluster of differentiation 1

CD28 – Cluster of differentiation 28

CD4 – Cluster of differentiation 4

CD8 – Cluster of differentiation 8

*Dhrs1* – Mitochondrial inner membrane protein dehydrogenase member 1

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

FITC – Fluorescein isothiocyanate

GTT – Glucose tolerance test  
HFD – High-fat diet  
Hif1an – Hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit inhibitor  
ICOS – Inducible T-cell stimulator  
IL-10 – Interleukin 10  
IL-1 $\beta$  – Interleukin 1 beta  
IL-6 – Interleukin 6  
iNKT – Invariant natural killer cell  
ITT – Insulin tolerance test  
KITTT – Constant decay during the insulin tolerance test  
Map3k9 – Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9  
MCH – Major histocompatibility complex  
ME – Median eminence  
NKT – Natural killer cells  
NPY – Neuropeptide Y  
OP – Obesity-prone  
OR – Obesity-resistant  
PBS – Phosphate-buffered saline  
PCR – Polymerase-chain reaction  
POMC – Proopiomelanocortin  
PUFA – Polyunsaturated fatty acid  
SDS – Sodium dodecylsulfate  
TLR4 – Toll-like receptor 4  
TNF- $\alpha$  – Tumor necrosis factor alpha  
VLA4 – Very late antigen 4

### **Author Contributions**

BB and LAV designed the experiments; BB, AFSR, MF, CS, and GN performed the experiments; RCG and ERR performed bioinformatics analysis; BB and LAV discussed and organized results; BB and LAV wrote the paper; LAV was also responsible for funding acquisition. All authors contributed to the editing and discussion of the manuscript.

**Ethics approval**

The animal experiments performed in the present study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA 3205-1 and 4624-1).

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Acknowledgments**

We thank Erika Roman, Gerson Ferraz, and Marcio Cruz from the University of Campinas for technical assistance. Grants for this study were provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The Laboratory of Cell Signaling belongs to the Obesity and Comorbidities Research Center and the National Institute of Science and Technology – Diabetes and Obesity.

**Funding**

São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2013/07607 – 2013/25415-9)

**Consent for publication under Declaration**

Not applicable

**Data Availability**

Please contact author for data requests

## References

- Andreux, P.A., Williams, E.G., Koutnikova, H., Houtkooper, R.H., Champy, M.F., Henry, H., Schoonjans, K., Williams, R.W., Auwerx, J., 2012. Systems genetics of metabolism: the use of the BXD murine reference panel for multiscale integration of traits. *Cell* 150, 1287-1299.
- Apovian, C.M., Aronne, L.J., Bessesen, D.H., McDonnell, M.E., Murad, M.H., Pagotto, U., Ryan, D.H., Still, C.D., Endocrine, S., 2015. Pharmacological management of obesity: an endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 342-362.
- Araujo, E.P., de Souza, C.T., Velloso, L.A., 2014. Atypical transforming growth factor-beta signaling in the hypothalamus is linked to diabetes. *Nat Med* 20, 985-987.
- Arruda, A.P., Milanski, M., Coope, A., Torsoni, A.S., Ropelle, E., Carvalho, D.P., Carnevali, J.B., Velloso, L.A., 2011. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology* 152, 1314-1326.
- Bailey-Bucktrout, S.L., Martinez-Llordella, M., Zhou, X., Anthony, B., Rosenthal, W., Lucche, H., Fehling, H.J., Bluestone, J.A., 2013. Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. *Immunity* 39, 949-962.
- Cavadas, C., Aveleira, C.A., Souza, G.F., Velloso, L.A., 2016. The pathophysiology of defective proteostasis in the hypothalamus - from obesity to ageing. *Nat Rev Endocrinol* 12, 723-733.
- Clee, S.M., Attie, A.D., 2007. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocr Rev* 28, 48-83.
- Cnop, M., Fougere, F., Velloso, L.A., 2012. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 18, 59-68.
- Cohen, N.R., Garg, S., Brenner, M.B., 2009. Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv Immunol* 102, 1-94.
- Collaborators, G.B.D.O., Afshin, A., Forouzanfar, M.H., Reitsma, M.B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., Marczak, L., Mokdad, A.H., Moradi-Lakeh, M., Naghavi, M., Salama, J.S., Vos, T., Abate, K.H., Abbafati, C., Ahmed, M.B., Al-Aly, Z., Alkerwi, A., Al-Raddadi, R., Amare, A.T., Amberbir, A., Amegah, A.K., Amini, E., Amrock, S.M., Anjana, R.M., Arnlov, J., Asayesh, H., Banerjee, A., Barac, A., Baye, E., Bennett, D.A., Beyene, A.S., Biadgilign, S., Biryukov, S., Bjertness, E., Boneya, D.J., Campos-Nonato, I., Carrero, J.J., Cecilio, P., Cercy, K., Ciobanu, L.G., Cornaby, L., Damtew, S.A., Dandona, L., Dandona, R., Dharmaratne, S.D., Duncan, B.B., Eshrati, B., Esteghamati, A., Feigin, V.L., Fernandes, J.C., Furst, T., Gebrehiwot, T.T., Gold, A., Gona, P.N., Goto, A., Habtewold, T.D., Hadush, K.T., Hafezi-Nejad, N., Hay, S.I., Horino, M., Islami, F., Kamal, R., Kasaeian, A., Katikireddi, S.V., Kengne, A.P., Kesavachandran, C.N., Khader, Y.S., Khang, Y.H., Khubchandani, J., Kim, D., Kim, Y.J., Kinfu, Y., Kosen, S., Ku, T., Defo, B.K., Kumar, G.A., Larson, H.J., Leinsalu, M., Liang, X., Lim, S.S., Liu, P., Lopez, A.D., Lozano, R., Majeed, A., Malekzadeh, R., Malta, D.C., Mazidi, M., McAlinden, C., McGarvey, S.T., Mengistu, D.T., Mensah, G.A., Mensink, G.B.M., Mezgebe, H.B., Mirraikhimov, E.M., Mueller, U.O., Noubiap, J.J., Obermeyer, C.M., Ogbo, F.A., Owolabi, M.O., Patton, G.C., Pourmalek, F., Qorbani, M., Rafay, A., Rai, R.K., Ranabhat, C.L., Reinig, N., Safiri, S., Salomon, J.A., Sanabria, J.R., Santos, I.S., Sartorius, B., Sawhney, M., Schmidhuber, J., Schutte, A.E., Schmidt, M.I., Sepanlou, S.G., Shamsizadeh, M., Sheikhbahaei, S., Shin, M.J., Shiri, R., Shiue, I., Roba, H.S., Silva, D.A.S., Silverberg, J.I., Singh, J.A., Stranges, S., Swaminathan, S., Tabares-Seisdedos, R., Tadese, F., Tedla, B.A., Tegegne, B.S., Terkawi, A.S., Thakur, J.S., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Tyrovolas, S., Ukwaja, K.N., Uthman, O.A., Vaezghasemi, M., Vasankari, T., Vlassov, V.V., Vollset, S.E., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wesana, J., Westerman, R., Yano, Y., Yonemoto, N., Yonga, G., Zaidi, Z., Zenebe, Z.M., Zipkin, B., Murray, C.J.L., 2017. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med* 377, 13-27.
- Cornier, M.A., 2011. Is your brain to blame for weight regain? *Physiol Behav* 104, 608-612.
- De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146, 4192-4199.
- Dietrich, M.O., Liu, Z.W., Horvath, T.L., 2013. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate Agrp neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell* 155, 188-199.
- Douglass, J.D., Dorfman, M.D., Thaler, J.P., 2017. Glia: silent partners in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Diabetologia* 60, 226-236.
- Fioravante, M., Bombassaro, B., Ramalho, A.F., Dragano, N.R., Morari, J., Solon, C., Tobar, N., Ramos, C.D., Velloso, L.A., 2017. Inhibition of hypothalamic leukemia inhibitory factor exacerbates diet-induced obesity phenotype. *J Neuroinflammation* 14, 178.

- Fuente-Martin, E., Garcia-Caceres, C., Granada, M., de Ceballos, M.L., Sanchez-Garrido, M.A., Sarman, B., Liu, Z.W., Dietrich, M.O., Tena-Sempere, M., Argente-Arizon, P., Diaz, F., Argente, J., Horvath, T.L., Chowen, J.A., 2012. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J Clin Invest* 122, 3900-3913.
- Garcia-Caceres, C., Fuente-Martin, E., Argente, J., Chowen, J.A., 2012. Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Mol Metab* 1, 37-46.
- Gregor, M.F., Hotamisligil, G.S., 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29, 415-445.
- Gross, C.C., Schulte-Mecklenbeck, A., Runzi, A., Kuhlmann, T., Posevitz-Fejfar, A., Schwab, N., Schneider-Hohendorf, T., Herich, S., Held, K., Konjevic, M., Hartwig, M., Dornmair, K., Hohlfeld, R., Ziemssen, T., Klotz, L., Meuth, S.G., Wiendl, H., 2016. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E2973-2982.
- Herz, J., Paterka, M., Niesner, R.A., Brandt, A.U., Siffrin, V., Leuenberger, T., Birkenstock, J., Mossakowski, A., Glumm, R., Zipp, F., Radbruch, H., 2011. In vivo imaging of lymphocytes in the CNS reveals different behaviour of naive T cells in health and autoimmunity. *J Neuroinflammation* 8, 131.
- Huber, N., Sakai, N., Eismann, T., Shin, T., Kuboki, S., Blanchard, J., Schuster, R., Edwards, M.J., Wong, H.R., Lentsch, A.B., 2009. Age-related decrease in proteasome expression contributes to defective nuclear factor-kappaB activation during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 49, 1718-1728.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., Kroczeck, R.A., 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Ignacio-Souza, L.M., Bombassaro, B., Pascoal, L.B., Portovedo, M.A., Razolli, D.S., Coope, A., Victorio, S.C., de Moura, R.F., Nascimento, L.F., Arruda, A.P., Anhe, G.F., Milanski, M., Velloso, L.A., 2014. Defective regulation of the ubiquitin/proteasome system in the hypothalamus of obese male mice. *Endocrinology* 155, 2831-2844.
- Imai, Y., Shimaoka, M., Kurokawa, M., 2010. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *Int J Hematol* 91, 569-575.
- Irani, B.G., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., 2007. Altered hypothalamic leptin, insulin, and melanocortin binding associated with moderate-fat diet and predisposition to obesity. *Endocrinology* 148, 310-316.
- Ito, M., Blumberg, B.M., Mock, D.J., Goodman, A.D., Moser, A.B., Moser, H.W., Smith, K.D., Powers, J.M., 2001. Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adreno-leukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 1004-1019.
- Koch, M., Varela, L., Kim, J.G., Kim, J.D., Hernandez-Nuno, F., Simonds, S.E., Castorena, C.M., Vianna, C.R., Elmquist, J.K., Morozov, Y.M., Rakic, P., Bechmann, I., Cowley, M.A., Szigeti-Buck, K., Dietrich, M.O., Gao, X.B., Diano, S., Horvath, T.L., 2015. Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature* 519, 45-50.
- Kovalovsky, D., Uche, O.U., Eladad, S., Hobbs, R.M., Yi, W., Alonzo, E., Chua, K., Eidson, M., Kim, H.J., Im, J.S., Pandolfi, P.P., Sant'Angelo, D.B., 2008. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol* 9, 1055-1064.
- Le Thuc, O., Stobbe, K., Cansell, C., Nahon, J.L., Blondeau, N., Rovere, C., 2017. Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 197.
- Lin, K.C., Castro, A.C., 1998. Very late antigen 4 (VLA4) antagonists as anti-inflammatory agents. *Curr Opin Chem Biol* 2, 453-457.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., Harris, T.H., Kipnis, J., 2015. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337-341.
- Lynch, L., Hogan, A.E., Duquette, D., Lester, C., Banks, A., LeClair, K., Cohen, D.E., Ghosh, A., Lu, B., Corrigan, M., Stevanovic, D., Maratos-Flier, E., Drucker, D.J., O'Shea, D., Brenner, M., 2016. iNKT Cells Induce FGF21 for Thermogenesis and Are Required for Maximal Weight Loss in GLP1 Therapy. *Cell Metab* 24, 510-519.
- Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P.J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E.E., Tighe, M., Koay, H.F., Godfrey, D.I., Leadbetter, E.A., Sant'Angelo, D.B., von Andrian, U., Brenner, M.B., 2015. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat Immunol* 16, 85-95.
- Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O'Shea, D., O'Farrelly, C., Exley, M.A., 2012. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37, 574-587.
- Matsuda, J.L., Naidenko, O.V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C.R., Koezuka, Y., Kronenberg, M., 2000. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 192, 741-754.

- Meng, Q., Cai, D., 2011. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 286, 32324-32332.
- Milanski, M., Arruda, A.P., Coope, A., Ignacio-Souza, L.M., Nunez, C.E., Roman, E.A., Romanatto, T., Pascoal, L.B., Caricilli, A.M., Torsoni, M.A., Prada, P.O., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2012. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* 61, 1455-1462.
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., Curi, R., Oliveira, H.C., Carvalheira, J.B., Bordin, S., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2009. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29, 359-370.
- Morari, J., Anhe, G.F., Nascimento, L.F., de Moura, R.F., Razolli, D., Solon, C., Guadagnini, D., Souza, G., Mattos, A.H., Tobar, N., Ramos, C.D., Pascoal, V.D., Saad, M.J., Lopes-Cendes, I., Moraes, J.C., Velloso, L.A., 2014. Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity. *Diabetes* 63, 3770-3784.
- Morton, G.J., Meek, T.H., Schwartz, M.W., 2014. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 15, 367-378.
- Muller, M.J., Enderle, J., Boser-Westphal, A., 2016. Changes in Energy Expenditure with Weight Gain and Weight Loss in Humans. *Curr Obes Rep* 5, 413-423.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., Dehouck, B., 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 518, 943-962.
- Oh, T.S., Cho, H., Cho, J.H., Yu, S.W., Kim, E.K., 2016. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy* 12, 2009-2025.
- Ozcan, L., Ergin, A.S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M.G., Jr., Ozcan, U., 2009. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 9, 35-51.
- Pereira, C.S., Macedo, M.F., 2016. CD1-Restricted T Cells at the Crossroad of Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol Res* 2016, 2876275.
- Pi-Sunyer, X., Astrup, A., Fujioka, K., Greenway, F., Halpern, A., Krempf, M., Lau, D.C., le Roux, C.W., Violante Ortiz, R., Jensen, C.B., Wilding, J.P., Obesity, S., Prediabetes, N.N.S.G., 2015. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N Engl J Med* 373, 11-22.
- Portovedo, M., Ignacio-Souza, L.M., Bombassaro, B., Coope, A., Reginato, A., Razolli, D.S., Torsoni, M.A., Torsoni, A.S., Leal, R.F., Velloso, L.A., Milanski, M., 2015. Saturated fatty acids modulate autophagy's proteins in the hypothalamus. *PLoS One* 10, e0119850.
- Rahman, M.H., Bhusal, A., Lee, W.H., Lee, I.K., Suk, K., 2018. Hypothalamic inflammation and malfunctioning glia in the pathophysiology of obesity and diabetes: Translational significance. *Biochem Pharmacol*.
- Ramalho, A.F., Bombassaro, B., Dragano, N.R., Solon, C., Morari, J., Fioravante, M., Barbizan, R., Velloso, L.A., Araujo, E.P., 2018. Dietary fats promote functional and structural changes in the median eminence blood/spinal fluid interface-the protective role for BDNF. *J Neuroinflammation* 15, 10.
- Salio, M., Silk, J.D., Jones, E.Y., Cerundolo, V., 2014. Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annu Rev Immunol* 32, 323-366.
- Satoh, M., Hoshino, M., Fujita, K., Iizuka, M., Fujii, S., Clingan, C.S., Van Kaer, L., Iwabuchi, K., 2016. Adipocyte-specific CD1d-deficiency mitigates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Sci Rep* 6, 28473.
- Savage, A.K., Constantinides, M.G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., Bendelac, A., 2008. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 29, 391-403.
- Schneeberger, M., Dietrich, M.O., Sebastian, D., Imbernon, M., Castano, C., Garcia, A., Esteban, Y., Gonzalez-Franquesa, A., Rodriguez, I.C., Bortolozzi, A., Garcia-Roves, P.M., Gomis, R., Nogueiras, R., Horvath, T.L., Zorzano, A., Claret, M., 2013. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155, 172-187.
- Souza, G.F., Solon, C., Nascimento, L.F., De-Lima-Junior, J.C., Nogueira, G., Moura, R., Rocha, G.Z., Fioravante, M., Bobbo, V., Morari, J., Razolli, D., Araujo, E.P., Velloso, L.A., 2016. Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. *Sci Rep* 6, 29290.
- Sumithran, P., Prendergast, L.A., Delbridge, E., Purcell, K., Shulkes, A., Kriketos, A., Proietto, J., 2011. Long-term persistence of hormonal adaptations to weight loss. *N Engl J Med* 365, 1597-1604.
- Teige, A., Teige, I., Lavasani, S., Bockermann, R., Mondoc, E., Holmdahl, R., Issazadeh-Navikas, S., 2004. CD1-dependent regulation of chronic central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 172, 186-194.

- Thaler, J.P., Yi, C.X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., Nguyen, H.T., Fischer, J.D., Matsen, M.E., Wisse, B.E., Morton, G.J., Horvath, T.L., Baskin, D.G., Tschop, M.H., Schwartz, M.W., 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 122, 153-162.
- Valdearcos, M., Douglass, J.D., Robblee, M.M., Dorfman, M.D., Stifler, D.R., Bennett, M.L., Gerritse, I., Fasnacht, R., Barres, B.A., Thaler, J.P., Koliwad, S.K., 2017. Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. *Cell Metab* 26, 185-197 e183.
- Valdearcos, M., Robblee, M.M., Benjamin, D.I., Nomura, D.K., Xu, A.W., Koliwad, S.K., 2014. Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. *Cell Rep* 9, 2124-2138.
- van de Sande-Lee, S., Pereira, F.R., Cintra, D.E., Fernandes, P.T., Cardoso, A.R., Garlipp, C.R., Chaim, E.A., Pareja, J.C., Geloneze, B., Li, L.M., Cendes, F., Velloso, L.A., 2011. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes* 60, 1699-1704.
- Venkataswamy, M.M., Porcelli, S.A., 2010. Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin Immunol* 22, 68-78.
- Wadden, T.A., Hollander, P., Klein, S., Niswender, K., Woo, V., Hale, P.M., Aronne, L., Investigators, N.N., 2013. Weight maintenance and additional weight loss with liraglutide after low-calorie-diet-induced weight loss: the SCALE Maintenance randomized study. *Int J Obes (Lond)* 37, 1443-1451.
- Wang, Z.K., Xue, L., Wang, T., Wang, X.J., Su, Z.Q., 2016. Infiltration of invariant natural killer T cells occur and accelerate brain infarction in permanent ischemic stroke in mice. *Neurosci Lett* 633, 62-68.
- Wong, C.H., Jenne, C.N., Lee, W.Y., Leger, C., Kubes, P., 2011. Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science* 334, 101-105.
- Xu, H., Wu, Z.Y., Fang, F., Guo, L., Chen, D., Chen, J.X., Stern, D., Taylor, G.A., Jiang, H., Yan, S.S., 2010. Genetic deficiency of *Irgm1* (LRG-47) suppresses induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting apoptosis of activated CD4+ T cells. *FASEB J* 24, 1583-1592.
- Yan, J., Zhang, H., Yin, Y., Li, J., Tang, Y., Purkayastha, S., Li, L., Cai, D., 2014. Obesity- and aging-induced excess of central transforming growth factor-beta potentiates diabetic development via an RNA stress response. *Nat Med* 20, 1001-1008.
- Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F.J., Park, S.M., Cai, D., 2011. Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biol* 9, e1001112.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., Cai, D., 2008. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61-73.



## Legends for the Figures

**Figure 1. T-lymphocytes in the hypothalamus of mice fed a high-fat diet.** Mice were fed chow or a high-fat diet (HF) for one, three or 10 days (1d, 3d, 10d) and the hypothalami were employed for determination of CD4, CD8 and ICOS evaluating transcript expression by real-time PCR (A), protein by immunoblot (B-D) and cell distribution by immunofluorescence (E-F). Hypothalamic anatomical structures are depicted in G. In E-F, regions with largest numbers of CD4 and CD8 cells are indicated by the dashed red ellipses. In A, n = 4-7; in B-D, n = 4; in E-F, n = 3-4. \*p<0.05 vs. respective chow.

**Figure 2. Markers of T-lymphocytes are differentially expressed in the hypothalamus of obese-prone and obese-resistant mice.** Mice were fed a high-fat diet (HF) for 24 h and, according to caloric consumption, were defined as obese-resistant (OR) or obese-prone (OP) (A, left-hand panel); thereafter, mice were returned to chow for 15 days and then randomly selected for either chow or a HF for 10 days (A, right-hand panel). Mean daily food intake (B) and final body mass (C) were determined. In mice fed *ad libitum*, hypothalami were employed for determination of transcript expressions of CD4 (D), CD8 (E) and ICOS (F). Another group of OP and OR mice were submitted to a pair-feeding protocol (G) and body mass was determined at the end of the experimental period (H). Hypothalami were employed for determination of transcript expressions of CD4 (I), CD8 (J) and ICOS (K). In all experiments n = 5; \*p<0.05 vs. respective chow.

**Figure 3. CD1 in the hypothalamus of mice fed a high-fat diet.** Hypothalamic CD1 transcripts were determined in mice fed on chow or a high-fat diet (HF) and not separated as obese prone (OP) or obese resistant (OR) (A), separated in OP and OR and fed *ad libitum* (B) and separated in OP and OR and submitted to pair feeding (C). CD1 distribution was determined in the hypothalamus by immunofluorescence (D); regions with largest numbers of CD1 cells are indicated by the dashed red ellipses; arrows indicate the anatomical change in distribution of cells expressing CD1. CD1 transcript expression was determined in BV2 and CLU cell lines, in comparison with whole hypothalamus (E). The protein expression of CD1 was determined by

immunoblot in the hypothalami of mice treated with a pre-immune IgG or an anti-CD1 antibody (aCD1) (F). The transcript expressions of ICOS (G), CD4 (H), CD8 (I), TNF $\alpha$  (J), IL1 $\beta$  (K), IL6 (L) and IL10 (M) were determined in the hypothalami of mice fed on a high-fat diet and treated with a pre-immune IgG or an anti-CD1 antibody for three (3d) or 10 (10d) days. In A, n = 9-12; in B, n = 6; in C-M, n = 5. \*p<0.05 vs. chow; #p<0.05 vs. BV2.

**Figure 4. Metabolic outcomes of hypothalamic CD1 immunoneutralization.** Mice were submitted to an intracerebroventricular cannulation for treatment with either an anti-CD1 immunoneutralizing antibody (20 ng in 2  $\mu$ l, single dose) or a pre-immune IgG and then fed for 10 days on a high-fat diet. Actual body mass (A), body mass variation (B) and cumulative food intake (C) were determined during the experimental period. Energy expenditure (EE) was calculated (D); interscapular temperature was determined using an infrared thermo-sensitive camera (E); NPY (F) and POMC (G) transcripts were determined in the hypothalamus. A glucose tolerance test was performed (H) and the area under the glucose variation curve was calculated (I); fasting blood glucose (J) and insulin (K) were determined. An insulin tolerance test was performed and glucose values were determined (L); the constant of glucose decay during the insulin tolerance test was calculated (M). In all experiments n = 5; \*p<0.05 vs. IgG.

**Figure 5. Outcomes of CD1 activation in the hypothalamus of mice.** Mice were submitted to an intracerebroventricular cannulation for treatment with either alpha-galactosylceramide (alphaGalCer) (10 ng in 2  $\mu$ l, single dose) or vehicle (Veh) and then fed for 10 days on a high-fat diet. Actual body mass (A), body mass variation (B) and cumulative food intake (C) were determined during the experimental period. The interscapular temperature was measured using an infrared thermo-sensitive camera (D). Ucp1 (E) and Pgc1a (F) transcripts were determined in samples from the interscapular brown adipose tissue. A glucose tolerance test was performed and blood glucose levels were determined (G); blood insulin was measured in fasting mice (H). Mice were fed a high-fat diet (HF) for 24 h and, according to caloric consumption, were defined as obese-resistant (OR) or obese-prone (OP); thereafter, mice were returned to chow for 15 days and submitted to intracerebroventricular cannulation for

treatment with alphaGalCer (10 ng in 2  $\mu$ l, single dose) or vehicle (Veh) and then fed for 10 days on a high-fat diet. During the experimental period body mass variation (I) and cumulative food intake (J) were measured. In all experiments n=6. In A-H, \*p<0.05 vs. Veh. In I and J, \*p<0.05 vs. OP Veh.

**Figure 6. Inflammatory markers in the hypothalamus following CD1 activation in mice.**

Mice were submitted to an intracerebroventricular cannulation for treatment with either alpha-galactosylceramide (alphaGalCer) (10 ng in 2  $\mu$ l, single dose) or vehicle (Veh) and then fed for 10 days on a high-fat diet. The transcripts for CD1 (A), ICOS (B), CD4 (C), CD8 (D), TNF $\alpha$  (E), IL1 $\beta$  (F), IL6 (G) and IL10 (H) were determined in hypothalami of mice. In all experiments n=6; \*p<0.05 vs. Veh.

**Figure 7. Bioinformatics analysis of hypothalamic transcripts.** In A, hypothalamic CD1d1 mRNA levels across BXD mice families; B, corrgram showing positive (red) and negative (blue) correlations between CD1d1 and targets from hypothalamus and hippocampus of BXD mice; in C, heatmap showing mRNA levels of targets strongly correlated to hypothalamic CD1d1.

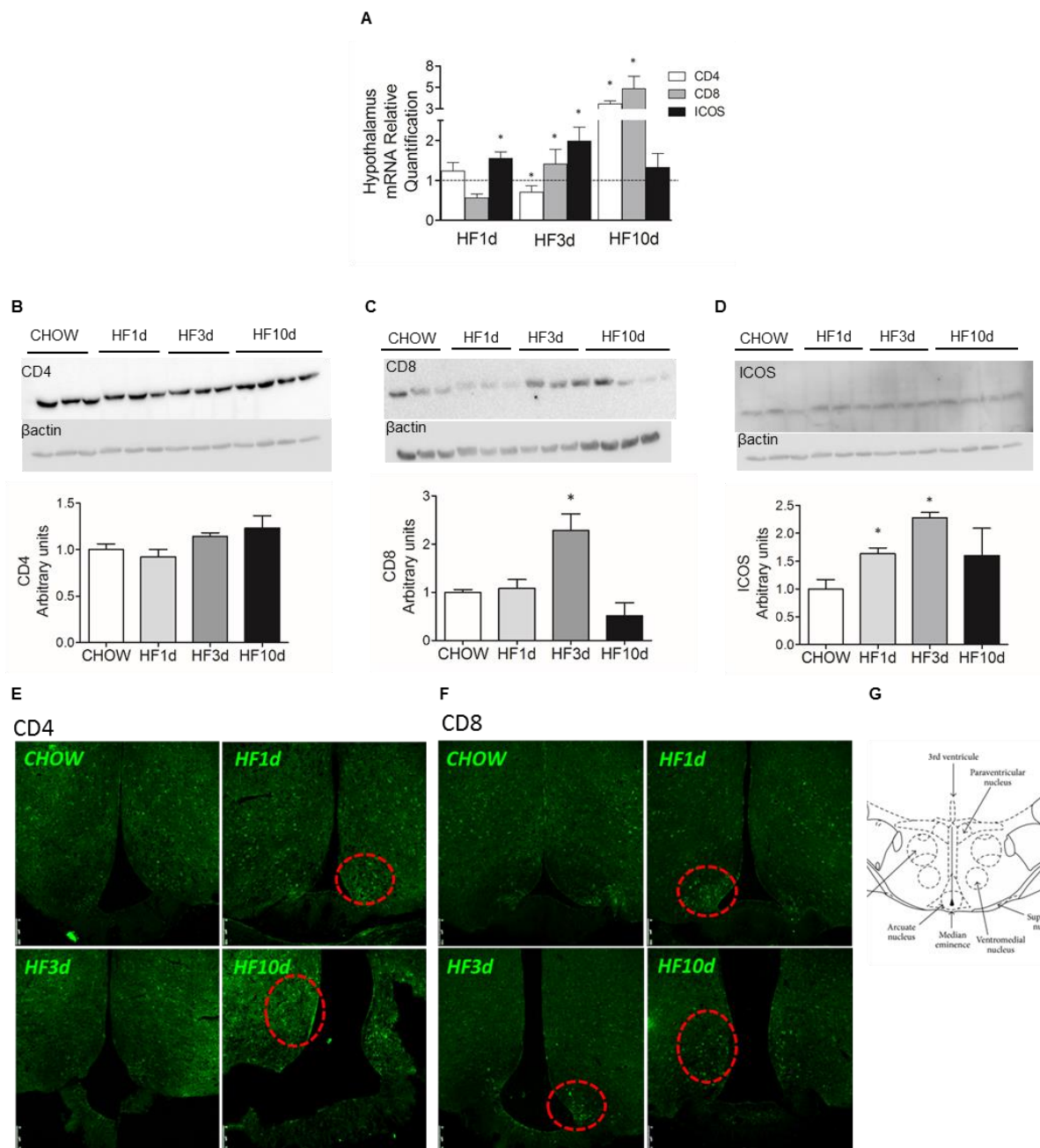
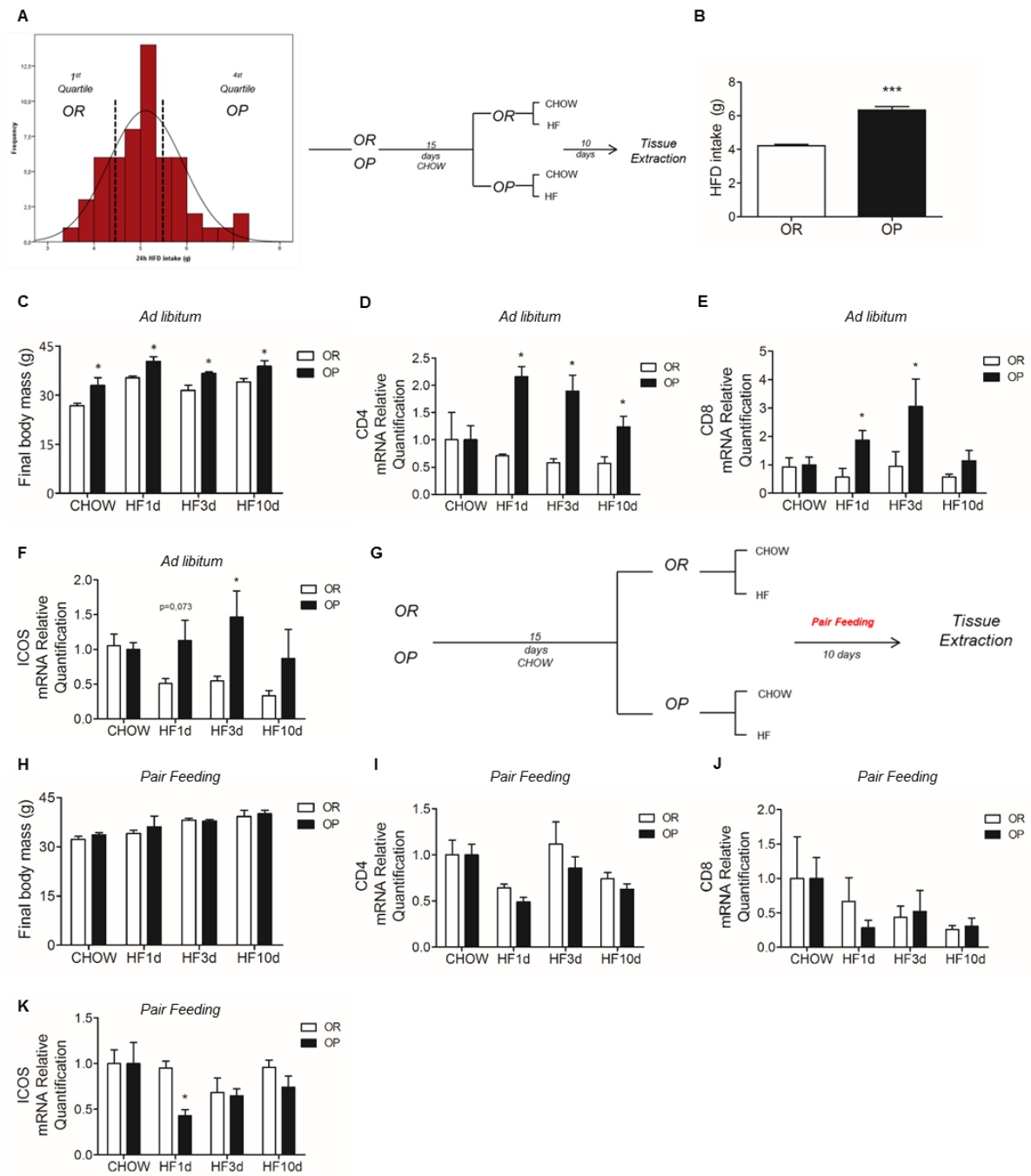
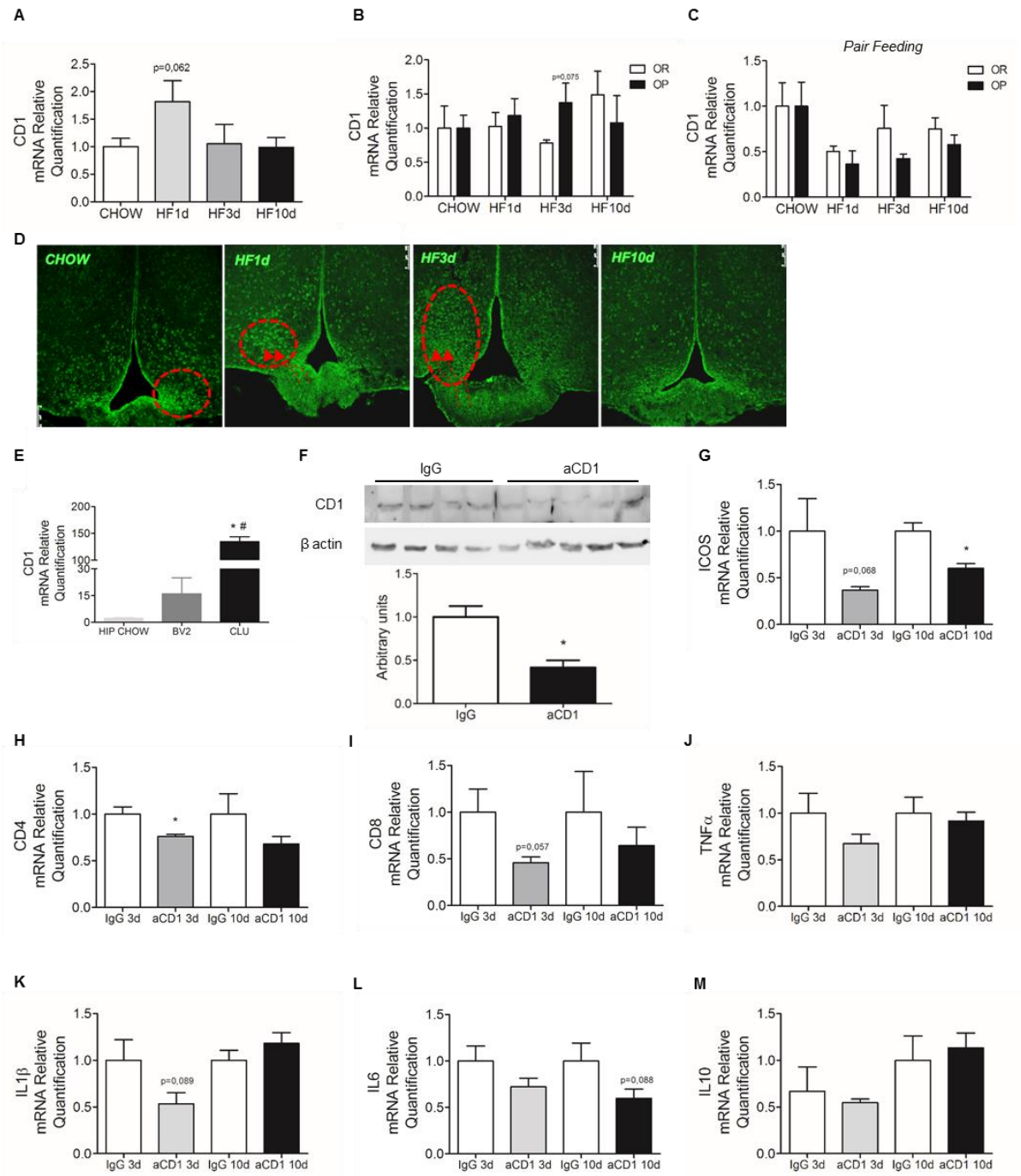


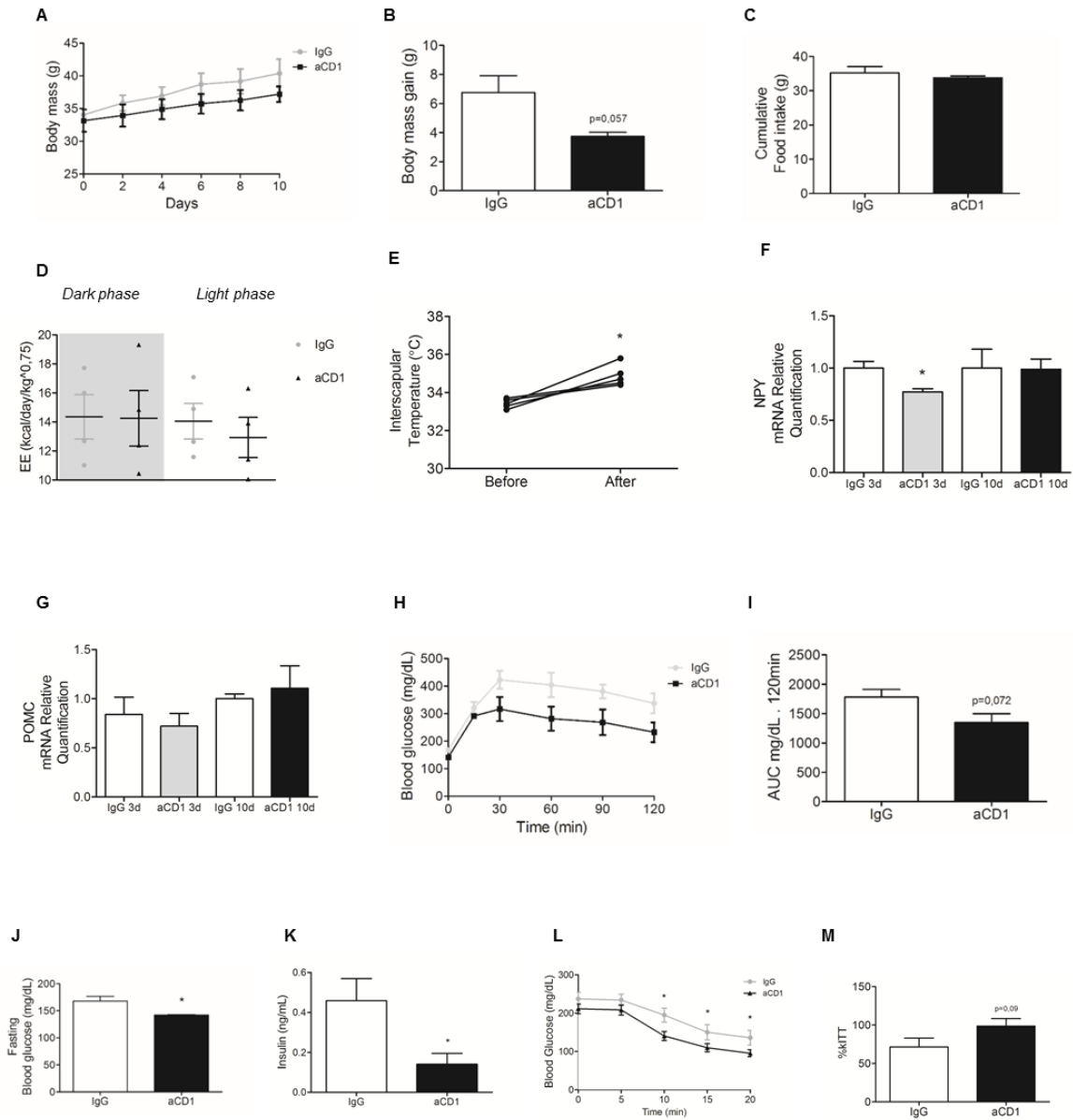
Figure 1



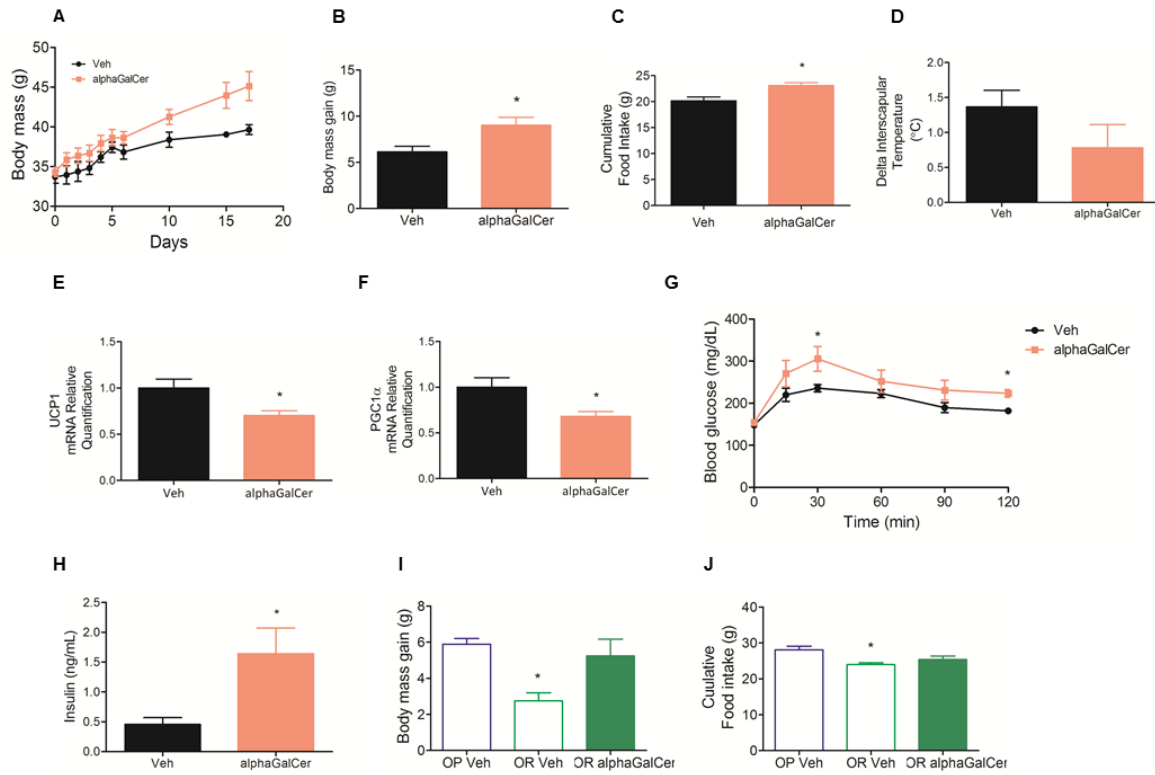
**Figure 2**



**Figure 3**

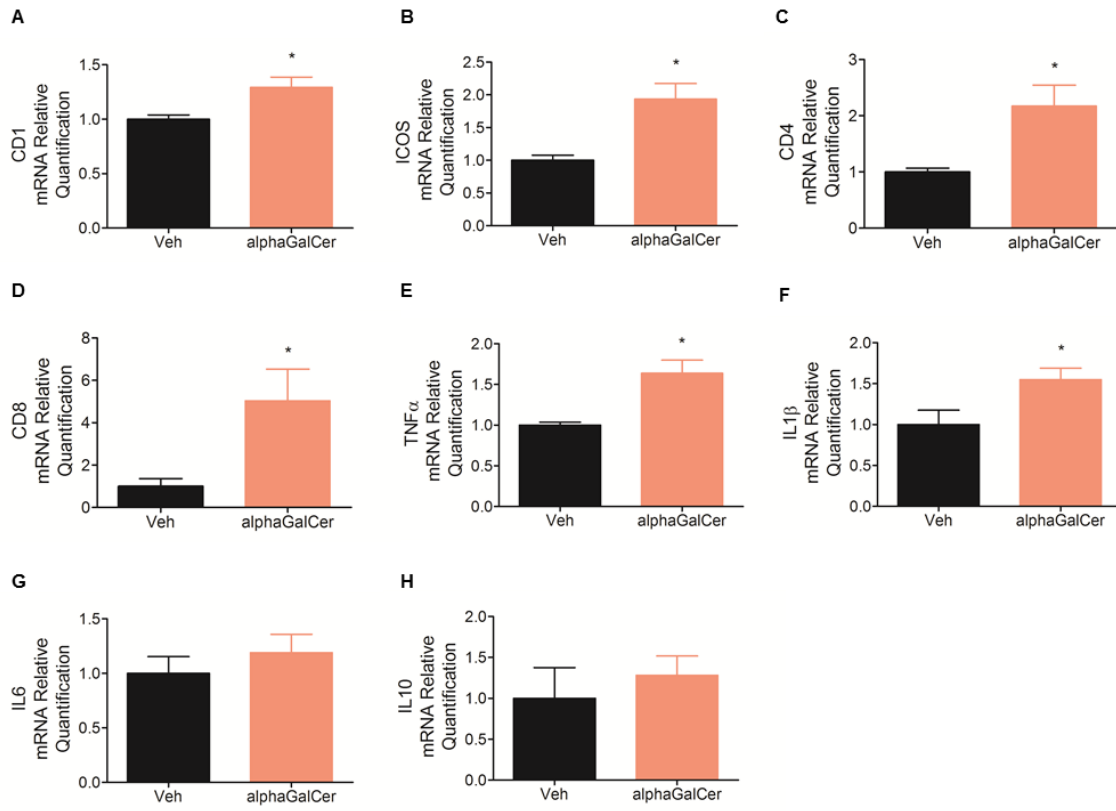


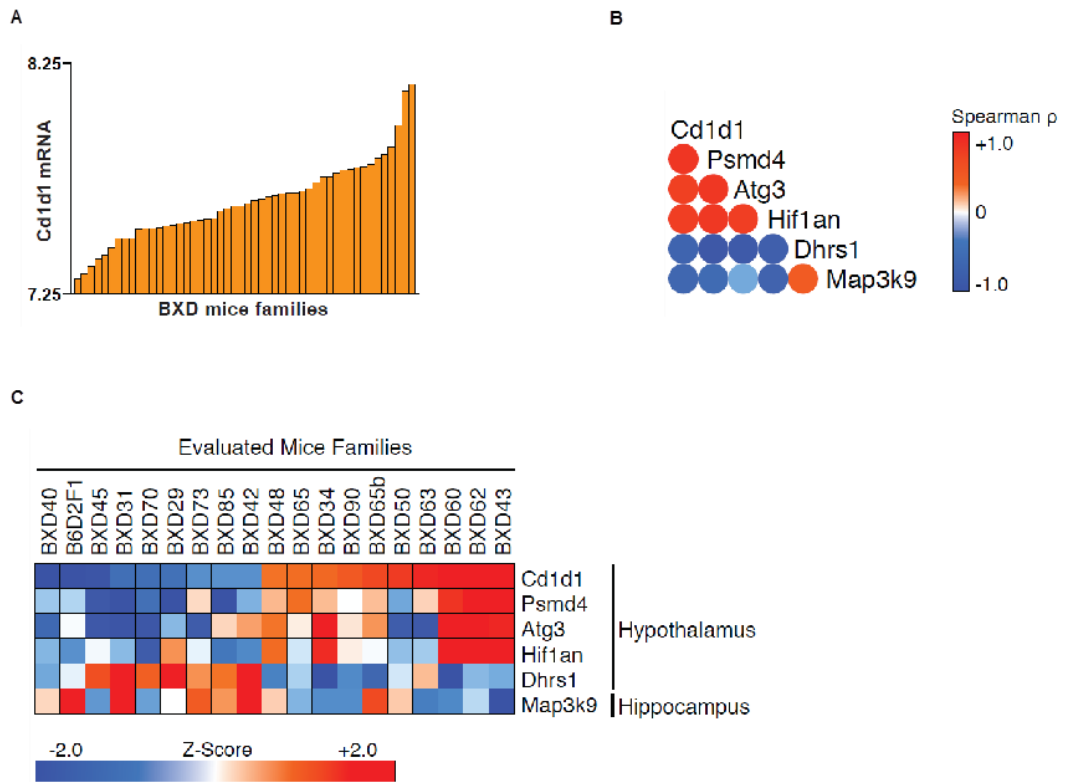
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**

## Supplementary Data

## CD1 is involved in diet-induced hypothalamic inflammation in obesity

Bruna Bombassaro<sup>1</sup>, Albina F. Ramalho<sup>1</sup>, Milena Fioravante<sup>1</sup>, Carina Solon<sup>1</sup>, Guilherme Nogueira<sup>1</sup>, Joseane Morari<sup>1</sup>, Rodrigo Gaspar<sup>2</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>2</sup>, Licio A. Velloso<sup>1</sup>

**Supplementary Table 1. Macro and micronutrient composition of chow and high-fat diet.**

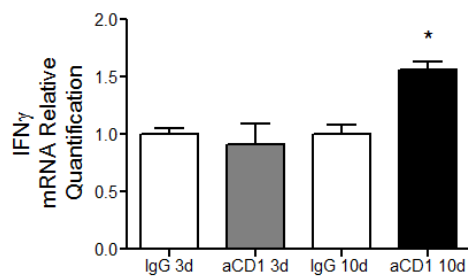
INGREDIENTS	CHOW DIET (g)	HIGH FAT DIET (g)
Starch	427,5	115,5
Protein (Casein)	200	200
Dextrinized Corn Starch	132	132
Sucrose	100	100
Soybean Oil	40	40
Lard	0	312
L-Cystine	3	3
Choline	2,5	2,5
Celulose (Fiber)	50	50
Minerals Mix	35	35
Vitamins Mix	10	10
TOTAL (g)	1000	1000

**Supplementary Table 2. Antibodies, chemicals and primers used in the study.**

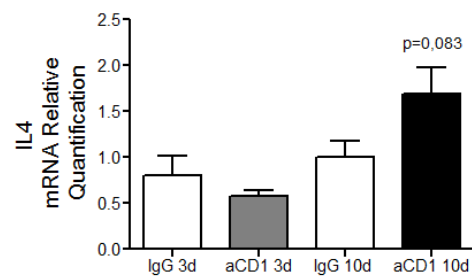
REAGENT	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Rabbit polyclonal anti-CD4	Santa Cruz Biotechnology	sc7219
Alexa Fluor 488 anti-mouse CD4	Biolegend BD Pharmingen	100423
Rabbit polyclonal anti-CD8	Santa Cruz Biotechnology	sc7188
Alexa Fluor 700 anti-mouse CD8a	Biolegend BD Pharmingen	100723
Goat polyclonal anti-ICOS	Santa Cruz Biotechnology	sc9553
Rabbit polyclonal anti-beta actin	Abcam	ab8227
Rabbit polyclonal anti-Integrin alpha 4 (VLA4)	Abcam	ab202969
Rabbit polyclonal anti-CD1	Santa Cruz Biotechnology	sc9161
Normal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc2027
Rabbit polyclonal anti-CD1d1	Bioss	bs 3690-R
Goat anti-rabbit IgG-FITC secondary antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc2012
<b>Chemicals</b>		
Alpha-GalactosylCeramide	AdipoGen Life Sciences	AG-CN2-0013
<b>Primers</b>		
CD1d2	IDT	Mm.PT.58.4223634319
CD4	Applied Biosystems	Mm00442754
CD8a	Applied Biosystems	Mm01182108
GAPDH	Applied Biosystems	4352339E
ICOS	IDT	Mm.PT.58.6938712
IL1 $\beta$	Applied Biosystems	Mm00434228
IL6	Applied Biosystems	Mm00446190
IL10	Applied Biosystems	Mm01288386
TNF $\alpha$	Applied Biosystems	Mm00443258

**Supplementary Figure 1. Immunoneutralization of CD1 in the hypothalamus of mice fed a high-fat diet.** Mice were submitted to an intracerebroventricular cannulation for treatment with either anti-CD1 (20 ng in 2  $\mu$ l, single dose) or similar volume of a pre-immune serum. The transcript expressions of interferon-gamma (IFN $\gamma$ , A) and interleukin-4 (IL4, B) were determined in the hypothalami of mice fed on a high-fat diet and treated with a pre-immune IgG or an anti-CD1 antibody for three (3d) or 10 (10d) days. In all experiments n=9; \*p<0.05 vs. chow.

A

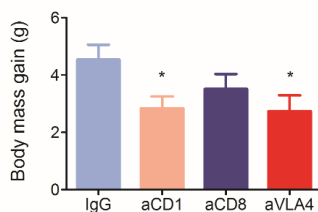


B

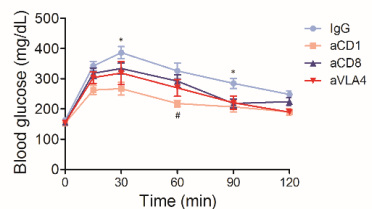


**Supplementary Figure 2. Hypothalamic immunoneutralizations of CD1, CD8 and VLA4.** Mice were submitted to an intracerebroventricular cannulation for treatment with either anti-CD1, anti-CD8 or anti-VLA4 immunoneutralizing antibodies (20 ng in 2  $\mu$ l, single dose) or a pre-immune IgG and then fed for 10 days on a high-fat diet. Body mass variation (A) was determined throughout the experimental period. A glucose tolerance test (B) was performed and the area under the glucose curve was calculated (C). In all experiments n = 7-11; p<0.05 vs. IgG.

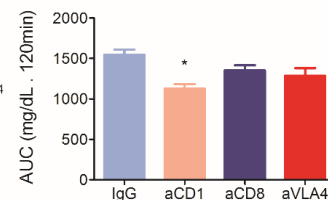
A



B

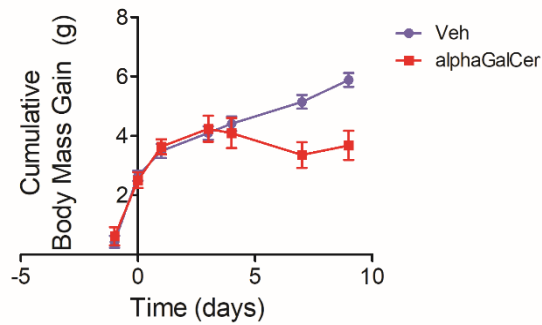


C

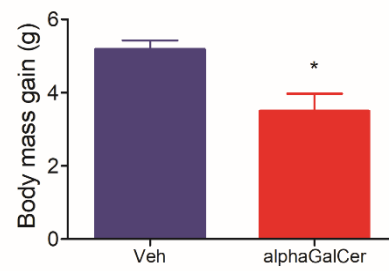


**Supplementary Figure 3. Effects of systemic treatment with alpha-galactosylceramide on body mass.** Mice fed on a high-fat diet for four weeks were treated with a single intraperitoneal dose of alpha-galactosylceramide (alphaGalCer) (1.0  $\mu$ g, single dose) or vehicle (Veh) and then maintained on a high-fat diet for an additional period of 10 days. Actual body mass (A) and body mass gain were determined during the experimental period. In all experiments  $n = 7-11$ ;  $p < 0.05$  vs. Veh.

A

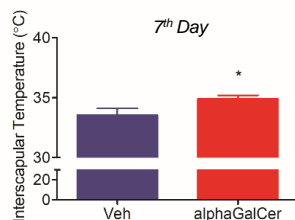


B

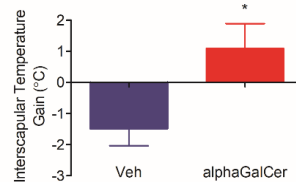


**Supplementary Figure 4. Effects of systemic treatment with alpha-galactosylceramide on brown adipose tissue function.** Mice fed on a high-fat diet for four weeks were treated with a single intraperitoneal dose of alpha-galactosylceramide (alphaGalCer) (1.0  $\mu$ g, single dose) or vehicle (Veh) and then maintained on a high-fat diet for an additional period of 10 days. Actual interscapular temperature (A) and interscapular temperature variation (B) were measured using a thermographic camera; a typical acquisition is shown in C. In all experiments  $n = 7-8$ ;  $p < 0.05$  vs. Veh.

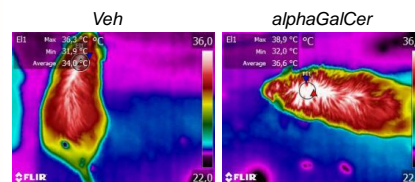
A



B



C



## 5.0 DISCUSSÃO

A inflamação hipotalâmica decorrente do consumo de dietas ricas em gorduras saturadas é o evento desencadeador da perda do controle homeostático da fome e do gasto energético. A produção de citocinas inflamatórias em resposta à ativação do sistema imune inato fosforila em serina substratos dos receptores de insulina e leptina, hormônios sinalizadores do estado nutricional e dos estoques energéticos. Essa fosforilação incorreta inviabiliza a transdução dos sinais homeostáticos, impedindo o correto controle da fome, levando à hiperfagia e ganho de peso. Em tecidos periféricos, o papel da resposta imune adaptativa na obesidade, representada majoritariamente pelos linfócitos T, tem sido extensivamente esmiuçada. A resposta imune, tanto inata como adaptativa, está presente em tecido adiposo e fígado, tanto de modelos animais de obesidade e síndrome metabólica como em humanos, e o status inflamatório dessa resposta usualmente está associado a um pior prognóstico metabólico nesses indivíduos (10, 91). Dessa forma, o controle da inflamação com a manipulação de linfócitos T no tecido adiposo, aumentando-se as células com perfil anti-inflamatório (Treg e Th2) e diminuindo as pró-inflamatórias (Th1 e TCD8) ameniza os efeitos da obesidade de forma sistêmica, reduzindo principalmente a resistência à insulina (55, 57).

Na última década, os avanços no entendimento do funcionamento e da fisiologia do sistema nervoso central colocaram o sistema imune adaptativo mais uma vez como autor de diversos capítulos dessa história. O paradigma de imunoprivilégio do sistema nervoso, ainda crente por alguns, vem sendo quebrado por diversos autores bem como a participação de células imunes em processos fisiológicos, como memória e aprendizado (77) e neurogênese (92) e processos patológicos, como doenças neurodegenerativas (93, 94, 95).

A inflamação hipotalâmica e os dados a ela associados se assemelham em muitos aspectos à distúrbios neurodegenerativos. Nesse trabalho mostramos que o consumo de dieta rica em gordura saturada aumenta a presença de linfócitos T no hipotálamo, assim como visto em modelos animais e em humanos com doenças como Alzheimer. A dieta hiperlipídica é capaz de aumentar os marcadores de linfócitos T tão rápido quanto 1 dia, e nos dias que se seguem, esse aumento se torna ainda mais expressivo.

A participação dos linfócitos T, principalmente T CD8<sup>+</sup>, em tecido adiposo na obesidade, já foi discutido aqui previamente. Sua presença é relevante e fator agravante

da inflamação e da piora metabólica neste tecido e no organismo como um todo, contribuindo, por exemplo, para a resistência à insulina. Neste trabalho, demonstramos que linfócitos T CD8 tem sua presença aumentada no hipotálamo já com 3 dias de dieta hiperlipídica, acompanhado de aumento na expressão de ICOS, marcador de linfócitos T ativados. Nenhum outro trabalho mostra a presença dessas células no sistema nervoso central no contexto da obesidade induzida por dieta, o que torna nossos achados de extrema relevância para o entendimento dos distúrbios associados ao ganho de peso e a etiologia do fenômeno de resistência hipotalâmica à insulina e leptina.

Além disso, o aumento na expressão de uma molécula apresentadora de lipídeos à linfócitos T e células NKT, o CD1, frente ao consumo de dieta, aumentou nosso interesse sobre a relação entre obesidade e resposta imune adaptativa no cérebro. O CD1 apresenta papel relevante no metabolismo de lipídeos e na obesidade no tecido adiposo (87, 88 ,89) e seu papel no sistema nervoso central vem sendo discutido no cenário de doenças neurodegenerativas (90).

A modulação de CD1 no sistema nervoso central frente ao consumo de dietas hiperlipídicas, é, nesse trabalho, mostrada pela primeira vez. O CD1, glicoproteína de membrana pertencente à família do MHC de classe I, pode ser dividido em dois grupos, de acordo com suas isoformas, em humanos. Grupo I, representado pelas moléculas “a”, “b” e “c”, expressos em timócitos e células dendríticas e grupo II, representado pela isoforma “d”, expresso em células da linhagem hematopoiética e também em células B, T, monócitos, células dendríticas e também no epitélio intestinal. A isoforma “d” é a única compartilhada entre camundongos e humanos, e por isso, a única estudada neste trabalho e nos demais que utilizam modelos animais (97). Em modelos animais de doenças neurodegenerativas, a presença de CD1 tem-se se mostrado um evento determinante na proteção contra a progressão da doença bem como marcador. A porcentagem de micróglia que expressa CD1 passa de 4% em camundongos saudáveis para 50% em camundongos com encefalomielite aguda (EAE), modelo experimental para Esclerose Múltipla, passando a representar 12% da população total de micróglia (98). Em condições inflamatórias, as células apresentadoras de antígeno do sistema nervoso central passam a expressar CD1, sendo encontrado em micróglia durante a desmielinização que acomete camundongos em modelo de Esclerose Múltipla bem como em astrócitos e micróglia reativos em humanos com a doença (99). Em estudos utilizando-se modelos *knockout* de corpo inteiro para CD1, essa molécula é importante para impedir a cronicidade da EAE, protegendo o animal contra uma inflamação descontrolada, exercendo nesses casos, efeito anti-inflamatório (90). As



doenças neurodegenerativas apresentam uma resposta imune diferente daquela observada na obesidade. A inflamação da primeira é muito mais aguda, associada a um grande dano tecidual e morte massiva de neurônios. Na obesidade, a resposta imune se apresenta mais crônica, menos intensa. Talvez por essa razão, nosso trabalho observou efeito oposto do CD1 no hipotálamo, no qual sua presença parece contribuir para o quadro inflamatório e não protetor, como visto pelos demais autores.

Em nosso trabalho, não mostramos quais células do hipotálamo estão expressando o CD1. Dados de imunofluorescência com colocação entre CD1 e marcadores de astrócitos, micróglia e neurônios são necessários para se demonstrar quais células, na situação analisada (consumo de dieta hiperlipídica) estão funcionando como apresentadoras de antígeno. Nosso dado de expressão gênica utilizando linhagem celular de micróglia e neurônio evidenciou expressão maior de CD1 nestes últimos, mas mais informações são necessárias para se confirmar essa hipótese.

O CD1 apresenta lipídeos, principalmente fosfolípides e esfingolípides para alguns tipos de linfócitos T e células iNKT (invariant Natural Killer T cells). Essas células são caracterizadas pela expressão de um TCR semi-variante. Elas diferem das células T por apresentar funções de sistema imune inato. Após expansão e maturação no timo, elas são capazes de responder a sinais inatos, como citocinas, por horas, mas também respondem à ligação do TCR a antígenos específicos (97). As células NKT são pouco estudadas. Há células NKT CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> (100) e a única estudada na atualidade é aquela capaz de responder a alphaGalactosylCeramide, agonista seletivo de CD1, utilizado nesse trabalho. O recente e fraco conhecimento que temos dessa célula limita e muito nosso trabalho. Além disso, essas células apresentam um padrão de produção de citocinas duplo. Elas podem responder de uma maneira inflamatória aguda e clássica, com produção de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  bem como ativar uma via alternativa, crônica, com produção de IL4 e IL13 (101). Esse perfil duplo causa confusão. Que situações essa célula contribui para controle da progressão da doença com ação anti-inflamatória e em que situações ela tem papel no desenvolvimento, recrutando mais células imunes e exacerbando a inflamação? Que fatores determinam esse perfil? O tipo de antígeno, a célula que está apresentando e o perfil imune do tecido são fatores sabidos, mas como eles se relacionam entre si e quais situações a célula apresenta determinado perfil, isso ainda é incerto. Além disso, que tipos de lipídeos o CD1 é capaz de apresentar é também pouco discutido. Neste trabalho, não identificamos que lipídeos possivelmente essa glicoproteína está apresentando. Lipídios provenientes da dieta ou provenientes de dano tecidual causado pela inflamação, como a mielina nos casos de doenças neurodegenerativas? O CD1 carregando lipídeos a ser apresentado, captura o mesmo no próprio SNC ou células mielóides periféricas adentram o hipotálamo, frente à

sinalização por citocinas inflamatórias, já com CD1 carregado de lipídio a ser apresentado?

Muitas dúvidas precisam ainda ser respondidas. Nosso trabalho abriu um novo horizonte, mostrando que há aumento de linfócitos T no hipotálamo logo no início do consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados; que há aumento de CD1 neste tecido e que a modulação deste apresenta ação relevante sobre a tolerância sistêmica à glicose bem como sobre o ganho de peso. Sua diminuição no hipotálamo levou à redução do ganho de peso e melhora do perfil glicêmico, enquanto seu aumento levou a efeitos contrários. O estudo mais aprofundado desses fenômenos pode representar um novo entendimento do efeito dos ácidos graxos da dieta sobre os distúrbios hipotalâmicos e as consequências da obesidade.

## 6.0 CONCLUSÃO

Tendo em vista a relevância da resposta imune para a fisiologia hipotalâmica na obesidade, nosso trabalho é o primeiro a mostrar que há um aumento de linfócitos T nessa região frente ao consumo de dieta hiperlipídica, bem como o efeito da quantidade de lipídeos ingeridos sobre esse aumento, evidenciado pelo efeito do consumo em animais propensos e resistentes à obesidade. Somos também os primeiros a relacionar a expressão hipotalâmica de CD1 a efeitos sistêmicos de controle glicêmico e ganho de peso e sua modulação no sistema nervoso central frente ao consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados.

## 7.0 REFERÊNCIAS

- (1) Swinburn, B. A., G. Sacks, K. D. Hall, K. McPherson, D. T. Finegood, M. L. Moodie and S. L. Gortmaker (2011). "The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments." *Lancet*378(9793): 804-814.
- (2) Vandevijvere, S., Chow, C.C., Hall, K.D., Umali, E., Swinburn, B.A. (2015). "Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis." *Bull World Health Organ*(7):446-56.
- (3) Collaborators GBDO, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, Marczak L, Mokdad AH, Moradi-Lakeh M, Naghavi M, Salama JS, Vos T, Abate KH, Abbafati C, Ahmed MB, Al-Aly Z, Alkerwi A, Al-Raddadi R, Amare AT et al. (2017) "Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years". *N Engl J Med* 377: 13-27
- (4) WHO, ObesityandOverweight, 2016, FactSheet, ReviewedFebruary 2018.
- (5) Vigitel Brasil 2016 Saúde Suplementar : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.
- (6) McKinsey Global Institute (2014). " OvercomingObesity: aninitialaconomicsanalysis." 1-106.
- (7) American Diabetes Association (2013). "Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012." *Diabetes Care*(36): 1033-1046.
- (8) American Diabetes Association (2018). "Economic costs of diabetes in the U.S. in 2017." *Diabetes Care*(36): 1033-1046.
- (9) Sumithran, P., Prendergast, L.A., Delbridge, E., Purcell, K., Shulkes, A., Kriketos, A., Proietto, J. (2011). "Long-term persistence of hormonal adaptation to weight loss." *N Engl J Med*(17):1597-604.
- (10) Apovian, C.M., Aronne, L.J., Bessesen, D.H., McDonnell, M.E., Murad, M.H., Pagotto, U., Ryan, D.H., Still, C.D. (2015). "Pharmacological management of obesity: an endocrine Society clinical practice guideline." *J Clin Endocrinol Metab.* (2):342-62.
- (11) Cornier, M.A. (2011). "Is your brain to blame for weight regain?". *Physiol Behav*(4):608-12
- (12) Morton, G. J., D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh and M. W. Schwartz (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." *Nature*443(7109): 289-295.
- (13) Velloso, L.A., Schwartz, M.W. (2011). "Altered hypothalamic function in diet-induced obesity." *International Journal of Obesity*(12): 1455-65.
- (14) Niswender, K. D., D. G. Baskin and M. W. Schwartz (2004). "Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis." *Trends Endocrinol Metab*15(8): 362-369.
- (15) Munzberg, H. and M. G. Myers, Jr. (2005). "Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance." *Nat Neurosci*8(5): 566-570.
- (16) Hetherington, A. W. and S. W. Ranson (1940). "Hypothalamic Lesions and Adiposity In The Rat." *The Anatomical Research*78(2): 23.
- (17) Anand, B. K. and J. R. Brobeck (1951). "Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat." *Proc Soc Exp Biol Med*77(2): 323-324.
- (18) Hervey, G.R. (1959). "The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats." *J Physiol*(145): 336–352.

- (19) Coleman D.L. (1973). "Effectsofparabiosisofobese with diabetes andnormal mice". *Diabetologia*(9): 294–298.
- (20) Clark, J.T., Kalra, P.S., Crowley, W.R., Kalra, S.P. (1984). "Neuropeptide Y andhumanpancreaticpolypeptidestimulatefeedingbehavior in rats". *Endocrinology*(115):427–9.
- (21) Stanley, B.G., Leibowitz, S.F. (1984). "Neuropeptide Y: stimulationoffeedinganddrinkingbyinjectionintothe paraventricularnucleus". *Life Sci*(35):2635–42.
- (22) Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., Cone, R.D. (1994). "Localizationofthe melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrineandautonomiccontrolcircuits in thebrain". *Molecular Endocrinology*(8):1298–1308.
- (23) Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D, et al. (1997). "Targetedisruptionofthe melanocortin-4 receptor results in obesity in mice". *Cell*(88):131–141.
- (24) Fong, T.M., Mao, C., MacNeil, T., Kalyani, R., Smith, T., Weinberg, D., Tota, M.R., Van der Ploeg, L.H. (1997). "ART (proteinproductofagouti-relatedtranscript) as anantagonistof MC-3 and MC-4 receptors". *BiochemicalandBiophysicalResearchCommunications*(237):629–631.
- (25) Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I., Stark, K.L. (1997). "OverexpressionofAgprt leads toobesity in transgenicmice". *NatureGenetics*(17):273–274.
- (26) Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G.S. (1997). "Antagonismof central melanocortinreceptors in vitro and in vivo byagouti-relatedprotein". *Science*(278):135–138.
- (27) Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., Schwartz, M.W. (1998). "CoexpressionofAgrpand NPY in fasting-activatedhypothalamicneurons". *Nat Neuroscience*(4): 271-2.
- (28) Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., Hochgeschwender, U. (1999). "Obesity in the mouse modelof pro- opiomelanocortindeficiencyrespondstoperipheralmelanocortin". *Nature Medicine* (9):1066-71.
- (29) Velloso, L. A., E. P. Araujoand C. T. De Souza (2008). "Diet-InducedInflammationoftheHypothalamus in Obesity." *Neuroimmunomodulation*15: 4.
- (30) Anderson, E.J., Çakir, I., Carrington, S.J., Cone, R.D., Ghamari-Langroudi, M., Gillyard, T., Gimenez, L.E., Litt, M.J. (2016). "60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by  $\alpha$ -MSH". *J MolEndocrinol*(4): 157-71.]
- (31) Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J., Porte, Jr D. (1996). "Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans". *Nat Med*(2):589–593.
- (32) Myers, Jr M.G., Leibel, R.L., Seeley, R.J., Schwartz, M.W. (2010). "Obesityandleptin resistance: distinguishing cause from effect". *Trends EndocrinolMetab*(21): 643–651.
- (33) van de Sande-Lee, S., Pereira, F.R., Cintra, D.E., Fernandes, P.T., Cardoso, A.R., Garlipp, C.R., Chaim, E.A., Pareja, J.C., Geloneze, B., Li, L.M., Cendes, F., Velloso, L.A. (2011). "Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects." *Diabetes*(6):1699-704.
- (34) Müller, M.J., Enderle, J., Bosity-Westphal, A. (2016). "Changes in Energy Expenditure with Weight Gain and Weight Loss in Humans." *CurrObes Rep.* (4):413-423.
- (35) Gregor, M.F., Hotamisligil, G.S. (2011). "Inflammatory mechanisms in obesity". *Annu Rev Immunol*(29):415–445.
- (36) Ajuwon, K. M. and M. E. Spurlock (2005). "Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes." *J Nutr*135(8): 1841-1846.

- (37) De Souza, C. T., E. P. Araujo, S. Bordin, R. Ashimine, R. L. Zollner, A. C. Boschero, M. J. Saad and L. A. Velloso (2005). "Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus." *Endocrinology* 146(10): 4192-4199.
- (38) Pirola, L., A. M. Johnston and E. Van Obberghen (2004). "Modulation of insulin action." *Diabetologia* 47(2): 170-184.
- (39) Bhoj, V. G. and Z. J. Chen (2009). "Ubiquitylation in innate and adaptive immunity." *Nature* 458(7237): 430-437.
- (40) Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F.E., Ratan, R., Rosenberg, P.A. et al. (2003). "Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway". *Proc Natl Acad Sci* (100): 8514–8519.
- (41) Milanski, M, Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M.L., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., Curi, R., Oliveira, H.C., Carvalheira, J.B.C., Bordin, S., Saad, M.J., Velloso, L.A. (2009). "Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity." *The Journal of Neuroscience* 29(2): 359-370.
- (42) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006). "Pathogen recognition and innate Immunity". *Cell* 124: 783–801.
- (43) Thaler, J.P., Yi, C.X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., Nguyen, H.T., Fischer, J.D., Matsen, M.E., Wisse, B.E., Morton, G.J., Horvath, T.L., Baskin, D.G., Tschöp, M.H., Schwartz, M.W. (2012). "Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans." *J Clin Invest.* 122(1): 153-62.
- (44) Morari, J., Anhe, G.F., Nascimento, L.F., de Moura, R.F., Razolli, D., Solon, C., Guadagnini, D., Souza, G., Mattos, A.H., Tobar, N., et al (2014). "Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity." *Diabetes* (63): 3770–84.
- (45) Fioravante, M., Bombassaro, B., Ramalho, A.F., Dragano, N.R., Morari, J., Solon, C., Tobar, N., Ramos, C.D., Velloso, L.A. (2017). "Inhibition of hypothalamic leukemia inhibitory factor exacerbates diet-induced obesity phenotype." *J Neuroinflammation* 14(1): 178.
- (46) Ramalho, A.F., Bombassaro, B., Dragano, N.R., Solon, C., Morari, J., Fioravante, M., Barbizan, R., Velloso, L.A., Araujo, E.P. (2017). "Dietary fats promote functional and structural changes in the median eminence blood/spinal fluid interface—the protective role for BDNF." *J Neuroinflammation* 15(1): 10.
- (47) Asghar, A., Sheikh, N. (2017). "Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance." *Cell Immunol.* (315): 18-26.
- (48) Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W. Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* (12): 1796-808.
- (49) Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest.* (12): 1821-3.
- (50) Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., Obin, M.S. (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." *J Lipid Res* (11): 2347-55.
- (51) Sell, H., Habich, C., Eckel, J. (2012). "Adaptive immunity in obesity and insulin resistance." *Nat Rev Endocrinol* (12): 709-16.
- (52) Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R. (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." *J Clin Invest* (1): 175-84.
- (53) Wozniak, S. E., L. L. Gee, M. S. Wachtel and E. E. Frezza (2009). "Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article." *Dig Dis Sci* 54(9): 1847-1856.

- (54) Nishimura, S., Manabe, I, Nagai, R. (2009). "Adipose Tissue Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome". *Discovery medicine*(41) 8:55-60.
- (55) Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., Nagai, R. (2009). "CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." *Nat Med.* (8):914-20.
- (56) Abbas, A.K., Lichtman, A.H.; *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico*. Editora Elsevier, 2ª edição, 2007.
- (57) Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., Mathis, D. (2009). "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters." *Nat Med*15(8):930-9.
- (58) Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., Maezawa, Y., Drucker, D.J., Engleman, E., Winer, D., Dosch, H.M. (2009). "Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy." *Nat Med.* (8):921-9.
- (59) Galea, I., Bechmann, I., and V. H. Perry (2007). "What is immune privilege (not)?" *Trends in Immunology*(28)1: 12–18.
- (60) Gimsa, U., Avrión-Mitchison, N. and Monika C. Brunner-Weinzierl (2013). "Immune Privilege as an Intrinsic CNS Property: Astrocytes Protect the CNS against T-Cell-Mediated Neuroinflammation" *Mediators of Inflammation.* (2013): 1-11.
- (61) Schwalbe, G. (1869). "Die Arachnoidalraum, ein Lymphraum und sein Zusammenhang mit den Perichoroidalraum." *Zentralbl Med Wiss.* ;7:465–467.
- (62) Földi, M., Gellért, A., Kozma, M., Poberai, M., Zoltán, O.T., Csanda, E. (1966). "New contributions to the anatomical connections of the brain and the lymphatic system." *Acta Anat (Basel)*64(4):498-505.
- (63) Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., Harris, T.H., Kipnis, J. (2015). "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels." *Nature*523(7560):337-41.
- (64) Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G.J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., Schwartz, M. (1998). "Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats." *Nat Med*4:814–821.
- (65) Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., Rolls, A., Mack, M., Pluchino, S., Martino, G., Jung, S., Schwartz, M. (2009). "Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice." *PLoS Med* 6:e1000113.
- (66) Barker, C.F., Billingham, R.E. (1977). "Immunologically privileged sites". *Adv Immunol*(25): 1-6.
- (67) Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F.H., Hoban, C.J., Reinherz, E.L., Weiner, H.L. (1983). "Immunohistochemical staining of human brain with monoclonal antibodies that identify lymphocytes, monocytes and the 1a antigen". *J Neuroimmunol*(5):197-205.
- (68) Paterson, P.Y., Day, E.D., Whitacre, C.C. (1981). "Neuroimmunologic diseases: Effector cell responses and immunoregulatory mechanisms". *Immunol Rev*(55):89-120.
- (69) Paterson, P.Y. and Day, E.D. (1982). "Current perspectives of neuroimmunological disease: Multiple Sclerosis and Experimental allergic encephalomyelitis". *Clin Immunol Rev*(1):581-697.
- (70) Liu, Y., He, X., Li, Y., Wang, T. (2018). "Cerebrospinal fluid CD4+ T lymphocyte-derived miRNA-let-7b can enhance the diagnostic performance of Alzheimer's disease biomarkers." *Biochem Biophys Res Commun* 495(1):1144-1150.

- (72) Merlini, M., Kirabali, T., Kulic, L., Nitsch, R.M., Ferretti, M.T. (2018). "Extravascular CD3+ T Cells in Brains of Alzheimer Disease Patients Correlate with Tau but Not with Amyloid Pathology: An Immunohistochemical Study." *Neurodegener Dis.* 18(1):49-56.
- (73) Bechmann, I., Steiner, B., Gimsa, U., Mor, G., Wolf, S., Beyer, M., Nitsch, R., Zipp, F (2002). "Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent," *Journal of Neuroimmunology*(132) 1-2: 60–65.
- (74) Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., Hess, H., Penna, G. and Adorini, L.(1999) "Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation," *European Journal of Immunology*(29) 9: 2705–2714.
- (75) Jehs, T., Faber, C., Juel, H.B., and Nissen, M.H. (2011). "Astrocytoma cells upregulate expression of pro-inflammatory cytokines after co-culture with activated peripheral blood mononuclear cells" *APMIS*(119) 8: 551–561.
- (76) Xu, Y-Z., Nygård, M., Kristensson, K., Bentivoglio, M. (2010). "Regulation of cytokine signaling and T-cell recruitment in the aging mouse brain in response to central inflammatory challenge". *Brain, Behavior, and Immunity*(24):138–152.
- (77) Filiano, A.J., Xu, Y., Tustison, N.J., Marsh, R.L., Baker, W., Smirnov, I., Overall, C.C., Gadani, S.P., Turner, S.D., Weng, Z., Peerzade, S.N., Chen, H., Lee, K.S., Scott, M.M., Beenhakker, M.P., Litvak, V., Kipnis, J. (2016). "Unexpected role of interferon- $\gamma$  in regulating neuronal connectivity and social behaviour." *Nature*535(7612):425-9.
- (78) Derecki, N.C., Cardani, A.N., Yang, C.H., Quinnes, K.M., Cihfield, A., Lynch, K.R., Kipnis, J. (2010). "Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4." *J Exp Med.* 207(5):1067-80.
- (79) Owen, J.A., Punt, J., Stranford, S.A. *Kuby Immunology*. W.H. Freeman and Company, New York, Seventh Edition, 2009.
- (80) Shamshiev, A., Donda, A., Carena, I., Mori, L., Kappos, L., De Libero, G. (1999). "Self-glycolipids as T-cell autoantigens." *Eur J Immunol.* (5):1667-75.
- (81) Brossay, L., D. Jullien, S. Cardell, B. C. Sydora, N. Burdin, R. L. Modlin, and M. Kronenberg. (1997). Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J. Immunol.* 159:1216.
- (82) Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2000). NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat. Immunol.* 1:459–460.
- (83) Wilson, S.B., and Delovitch, T.L. (2003). Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3:211–222.
- (84) Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlong, S.T., Brenner, M.B. (1994). "Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells." *Nature*(6507):691-4.
- (85) Kaczmarek, R., Pasciak, M., Szymczak-Kulus, K., Czerwinski, M.(2017). "CD1: A Singed Cat of the Three Antigen Presentation Systems." *Arch Immunol TherExp (Warsz).*;65(3):201-214.
- (86) Satoh, M., Hoshino, M., Fujita, K., Iizuka, M., Fujii, S., Clingan, C.S, Van Kaer, L., Iwabuchi, K. (2016). "Adipocyte-specific CD1d-deficiency mitigates diet-induced obesity and insulin resistance in mice." *Sci Rep.* (6):28473.
- (87) Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O'Shea, D., O'Farrelly, C., Exley, M.A. (2012). "Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production." *Immunity.* (3):574-87.
- (88) Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P.J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E.E., Tighe, M., Koay, H.F., Godfrey, D.I., Leadbetter, E.A., Sant'Angelo, D.B., von Andrian, U., Brenner, M.B. (2015). "Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue." *Nat Immunol.* (1):85-9.



- (89) Lynch, L., et al. (2016) "iNKT Cells Induce FGF21 for Thermogenesis and Are Required for Maximal Weight Loss in GLP1Therapy". *Cell Metabolism* 24: 510-519.
- (90) Teige, A., Teige, I., Lavasani, S., Bockermann, R., Mondoc, E., Holmdahl, R., Issazadeh-Navikas, S. (2004). "CD1-dependent regulation of chronic central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis". *J Immunol.*172(1):186-94.
- (91) Jialal, I., Kaur, H., Devaraj, S. (2014). "Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective." *J Clin Endocrinol Metab.*99(1):39-48.
- (92) Schwartz, M., Kipnis, J., Rivest, S. and Prat, A. (2013). "How Do Immune Cells Support and Shape the Brain in Health, Disease, and Aging?". *The Journal of Neuroscience*33(45):17587–17596.
- (93) Merlini, M., Kirabali, T., Kulic, L., Nitsch, R.M., Ferretti, M.T. (2018); "Extravascular CD3+ T Cells in Brains of Alzheimer Disease Patients Correlate with Tau but Not with Amyloid Pathology: An Immunohistochemical Study." *Neurodegener Dis.* 18(1):49-56.
- (94) Liu, Y., He, X., Li, Y., Wang, T. (2017). "Cerebrospinal fluid CD4+ T lymphocyte-derived miRNA-let-7b can enhance the diagnostic performance of Alzheimer's disease biomarkers." *Biochem Biophys Res Commun.*495(1):1144-1150.
- (95) Ferretti, M.T., Merlini, M., Späni, C., Gericke, C., Schweizer, N., Enzmann, G., Engelhardt, B., Kulic, L., Suter, T., Nitsch, R.M. (2016). "T-cell brain infiltration and immature antigen-presenting cells in transgenic models of Alzheimer's disease-like cerebral amyloidosis." *Brain Behav Immun*54:211-225.
- (96) Andreux, P.A., Williams, E.G., Koutnikova, H., Houtkooper, R.H., Champy, M.F., Henry, H., Schoonjans, K., Williams, R.W., Auwerx, J., 2012. Systems genetics of metabolism: the use of the BXD murine reference panel for multiscalar integration of traits. *Cell* 150, 1287-1299.
- (97) Pereira, C.S., Macedo, M.F., 2016. CD1-Restricted T Cells at the Crossroad of Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol Res* 2016, 2876275.
- (98) Busshoff, U., Hein, A., Iglesias, A., Dörries, R., Régner-Vigouroux, A. 2001. CD1 expression is differentially regulated by microglia, macrophages and T cells in the central nervous system upon inflammation and demyelination. *J Neuroimmunol.*113(2):220-30.
- (99) Mars, L.T., Gautron, A.S., Novak, J., Beaudoin, L., Diana, J., Liblau, R.S., Lehuen, A. 2008. Invariant NKT cells regulate experimental autoimmune encephalomyelitis and infiltrate the central nervous system in a CD1d-independent manner. *J Immunol.*181(4):2321-9.
- (100) Prussin, C., and Foster, B. 1997. TCR V-alpha-24 and V-beta-11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J. Immunol.* 159:5862–5870.
- (101) Wilson, S.B., and Delovitch, T.L. 2003. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3:211–222.

## 8.0 ANEXOS



UNICAMP



CEUA/Unicamp

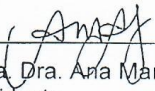
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da Resposta Imune Adaptativa na Inflamação do Hipotálamo na Obesidade" (protocolo nº 3205-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Lício Augusto veloso / Bruna Bombassaro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 27 de novembro de 2013.

Campinas, 27 de novembro de 2013.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guarnaldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva



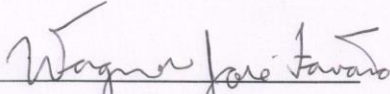
### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da Resposta Imune Adaptativa na Inflamação do Hipotálamo na Obesidade**, registrada com o nº **4624-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Licio Augusto Velloso e Bruna Bombassaro**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **16 de agosto de 2017**.

Finalidade:	( ) Ensino      ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/01/2017-01/06/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/08/2017-01/06/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	180
Peso / Idade:	04 semanas / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 16 de agosto de 2017.

  
 Prof. Dr. Wagner José Fávares  
 Presidente

  
 Fátima Alonso  
 Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.