



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas

Rodrigo Pereira Prates

**EFEITOS DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM ELEMENTOS DA
RESPOSTA IMUNE DA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Diamantina

2020

Rodrigo Pereira Prates

**EFEITOS DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM ELEMENTOS DA
RESPOSTA IMUNE DA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabethe Adriana Esteves

Diamantina

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P912e

Prates, Rodrigo Pereira.

Efeitos do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em elementos da resposta imune da mucosa intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Rodrigo Pereira Prates, 2020.

95 p.

Orientadora: Elizabethe Adriana Esteves

Dissertação (Mestrado – Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Obesidade. 2. *Caryocar brasiliense*. 3. Óleo de pequi. 4. Mucosa intestinal. 5. Resposta imune. I. Esteves, Elizabethe Adriana. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 616.4

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa – CRB6/2972

Rodrigo Pereira Prates

**EFEITOS DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*) EM ELEMENTOS DA
RESPOSTA IMUNE DA MUCOSA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profª Drª Elizabethe Adriana Esteves

Data da aprovação: 03 / 03 / 2020



Drª Lauane Gomes Moreno - UFVJM



Profª Drª Helen Rodrigues Martins - UFVJM



Profª Drª Elizabethe Adriana Esteves - UFVJM

Diamantina

2020

Este trabalho é dedicado a todos que contribuíram e tornaram possível a sua realização, em especial à minha orientadora, Bethe, à Lauane, ao Paulo e ao grupo LabMet. Aos meus pais, que me apoiam incondicionalmente em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Um objetivo alcançado com crescimento e superação, mas não há mérito pessoal em realizações em conjunto.

Então, primeiramente agradeço a Deus, pela dádiva da vida, por estar comigo em todas as adversidades, me guiando e abençoando.

Agradeço aos meus pais, sustentáculos inquestionáveis que me apoiaram durante todo o percurso dessa jornada, que com todo zelo, carinho e apoio possibilitaram que eu chegasse até o final.

À minha avó materna pelo companheirismo e pela ajuda incontestável. Aos demais familiares pela palavra amiga e conselhos motivadores.

Aos colegas e amigos que sempre estiveram presentes em meio a frustrações e realizações e que direta ou indiretamente contribuíram com este momento.

À professora Dr^a Elizabethe Esteves, por ser uma apoiadora e motivadora desde o momento em que comecei a trabalhar em seu grupo de pesquisa. Obrigado por me direcionar, pelo tempo dedicado, pela paciência em ensinar, pelo amor à pesquisa, o que nos instiga a sempre continuar, e por ter me orientado durante este trabalho. O tempo que trabalhamos juntos foi enriquecedor. Obrigado.

Ao professor Dr^o Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo pelos ensinamentos relacionados ao fantástico e instigante mundo da imunologia e pelo direcionamento durante o desenvolvimento do presente estudo.

Ao professor Dr^o Wagner de Fátima Pereira pelo apoio através de recursos relacionados à pesquisa, o que viabilizou a realização deste trabalho.

À Dr^a Lauane Gomes Moreno. Lau, sem você este trabalho não teria sido realizado. Sou imensamente grato por todos os seus ensinamentos, paciência, ajuda, suporte e bondade. Hoje sou um torcedor ávido pelo seu sucesso. Obrigado ainda pelas palavras amigas nos momentos de dificuldades.

Ao meu amigo-irmão Msc. Paulo Henrique Evangelista Silva, em primeiro lugar pela amizade e carinho que me reconforta, me apoia e me traz grandes alegrias. Obrigado pela ajuda, apoio e suporte incondicional que você teve comigo. Você foi uma peça chave para a realização deste trabalho. Obrigado pela companhia durante estes dois anos, pelo apoio durante a nossa temporada em São Paulo, por todos os passeios, conversas, conselhos, por me escutar, me impulsionar e permitir que eu fizesse parte também da sua jornada. É um grande amigo que sempre vou levar comigo.

Ao grupo LabMet por toda a ajuda e suporte, Edivânia, Mateus, Mayara, Jordane, Camila, Maria Thereza, Luciano, Eduardo. À Arsenísia que sempre será uma “Labzete”.

À equipe dos laboratórios Labimuno e Bioex: obrigado por tudo, foram muitas as ajudas, ensinamentos e conversas. Sou muito grato a todos vocês.

Aos amigos que fiz em Diamantina durante este tempo que morei aqui. Vocês foram imprescindíveis através do apoio e injeções de ânimo durante todos os momentos difíceis e é claro por todos os momentos felizes que passamos juntos.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri pelo acolhimento e suporte durante o curso da pós-graduação, em particular o Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de pesquisa. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos, obrigado!

RESUMO

Evidências científicas apontam que compostos da dieta, tais como ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e carotenoides, em sua forma isolada ou extraída, parecem modular a resposta imune da mucosa intestinal. O óleo de pequi (OP) é rico em MUFA e carotenoides. Nós mostramos previamente efeito imunomodulador do OP na mucosa intestinal de camundongos saudáveis e com colite ulcerativa aguda. Entretanto, este efeito ainda não foi investigado no contexto da obesidade. O objetivo deste estudo foi investigar efeitos do óleo de pequi sobre elementos da resposta imune da mucosa intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Para tal, 48 camundongos C57BL/6 machos foram distribuídos em quatro grupos: C, que recebeu dieta controle, CP que recebeu dieta C e OP; HL que recebeu dieta hiperlipídica e HLP, que recebeu dieta HL e OP. O OP foi ofertado diariamente em uma dose de 150 mg. O experimento teve duração de 10 semanas. Foram avaliados indicadores clínicos da obesidade, biomarcadores metabólicos sanguíneos e os fenótipos de leucócitos do compartimento intraepitelial e das placas de peyer da mucosa do intestino delgado e dos linfonodos mesentéricos. As massas corporais finais do grupo HLP se igualaram às dos grupos C e CP e foram igualmente inferiores ao grupo HL ($p < 0,05$). Apesar de o ganho de massa corporal do grupo HLP ter sido inferior ao HL ($p < 0,05$), não se igualou ao C e ao CP. A ingestão alimentar diária dos grupos HLP e CP foi igualmente menor que a do grupo C e ambas superiores ao HL ($p < 0,05$). A menor ingestão calórica foi a do grupo CP ($p < 0,05$) e não houve diferença entre HL e HLP. Os animais que ingeriram OP (CP e HLP) tiveram a adiposidade visceral semelhante ao grupo C e inferior ao HL ($p < 0,05$). A tolerância à glicose foi menor para os animais dos grupos HL e HLP em comparação aos controles (C e CP) ($p < 0,05$). O OP na dieta controle reduziu a contagem global de leucócitos no sangue ($p < 0,05$), mas este efeito foi perdido quando ele foi ingerido na dieta hiperlipídica. No compartimento intraepitelial, o OP elevou os leucócitos totais tanto no grupo CP quanto no grupo HLP e não afetou os linfócitos intraepiteliais em comparação ao HL ($p < 0,05$). Por outro lado, a dieta hiperlipídica elevou os linfócitos $T\gamma\delta$ e não houve efeito do OP ($p < 0,05$). Nos linfonodos mesentéricos, houve aumento percentual dos linfócitos para o grupo HLP em relação aos grupos C e HL, porém não foi significativo. Houve uma redução dos linfócitos T auxiliares no grupo CP em relação ao C ($p < 0,05$). Nas placas de peyer os leucócitos totais aumentaram no grupo HLP em relação aos grupos HL e C ($p < 0,05$). Não houve alterações expressivas nos demais tipos celulares entre os tratamentos. O óleo de pequi promoveu um aumento de leucócitos totais no epitélio intestinal do grupo HLP, possivelmente células da imunidade inata, como os macrófagos M2, com consequente reparo do epitélio intestinal, uma vez que os animais alimentados com dieta hiperlipídica e óleo de pequi apresentaram redução da massa corporal.

Palavras chaves: Obesidade. *Caryocar brasiliense*. Óleo de pequi. Mucosa intestinal. Resposta imune.

ABSTRACT

Scientific evidence has shown that diet compounds, such as monounsaturated fatty acids (MUFA) and carotenoids, in their isolated or extracted form, seem to modulate the immune response of the intestinal mucosa. *Pequi* oil (PO) is high in MUFA and carotenoids. We previously showed immunomodulatory effects of PO in the intestinal mucosa of healthy mice and with acute ulcerative colitis. However, this effect has not yet been investigated in the context of obesity. This study aimed to investigate PO effects on elements of the immune response of the intestinal mucosa of mice fed a high-fat diet. 48 C57BL/6 male mice were distributed into four groups: C, fed chow, CP fed chow and PO; HF fed a high-fat diet and HFP, fed HF and PO. The PO was offered at a 150 mg daily dose. The bioassay lasted 10 weeks. Clinical indicators of obesity, blood metabolic biomarkers, and the phenotypes of leukocytes from the intraepithelial compartment and Peyer's patches from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes were evaluated. Body mass from HFP was equal to C and CP groups, being equally lower than HF ($p < 0.05$). Although body mass gain of the HFP group was lower than HF ($p < 0.05$), it did not match to C and CP. Daily food intake of HFP and CP groups was also lower than C, being both higher than HF ($p < 0.05$). The lowest caloric intake was from the CP group ($p < 0.05$) and there was no difference between HF and HFP. PO animals (CP and HFP) had visceral adiposity similar to the C group and lower than HF ($p < 0.05$). Glucose tolerance was lower for HF and HFP groups compared to controls (C and CP) ($p < 0.05$). The PO in the control diet reduced the overall blood leukocytes count ($p < 0.05$), but this effect was lost when it was ingested in the high-fat diet (HFP). In the intestinal mucosa, PO elevated the total leukocytes in both CP and HFP groups and it did not affect intraepithelial lymphocytes compared to HF ($p < 0.05$). Otherwise, high-fat diet elevated T $\gamma\delta$ lymphocytes and there was no effect of PO ($p < 0.05$). In the mesenteric lymph nodes, there was an increase in intraepithelial lymphocytes for the HFP group compared to C and HF groups, but it was not significant. There was a reduction in auxiliary T lymphocytes in the CP group compared to C ($p < 0.05$). In the Peyer's patches the leukocytes increased in the HFP group compared to HF and C groups ($p < 0.05$). There were no significant changes in the other cell types between treatments. *Pequi* oil in a high-fat diet promoted an increase in immune cells from intestinal mucosa, possible macrophages, with consequent intestinal epithelium repair, which at last, may have contributed to lose body mass.

Keywords: Obesity. *Caryocar brasiliense*. *Pequi* oil. Intestinal mucosa. Immune response

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Diferenciação dos linfócitos intraepiteliais (LIE) naturais e induzidos.....	26
Figura 2 -	Componentes imunológicos do intestino delgado em homeostasia e repercussões no intestino durante a obesidade: aspectos diferenciais.....	30
Figura 3 -	Esquema ilustrativo do protocolo experimental.....	48
Figura 4 -	Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo.....	54
Figura 5 -	Sequência de procedimentos utilizados para a análise dos percentuais de Linfócitos T $\gamma\delta$ por citometria de fluxo.....	55
Figura 6 -	Efeitos do óleo de pequi na ingestão alimentar e calórica de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.....	57
Figura 7 -	Efeitos do óleo de pequi na massa corporal e na eficiência energética de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.....	59
Figura 8 -	Índice de adiposidade visceral e massas absolutas (g) e relativizadas pela massa corporal (%) da gordura dos compartimentos retroperitoneal, epididimal e mesentérico de camundongos alimentados com dieta balanceada e hiperlipídica contendo ou não óleo de pequi.....	60
Figura 9 -	Teste de tolerância intraperitoneal à glicose dos animais experimentais.....	61
Figura 10 -	Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T e suas subpopulações e de linfócitos T $\gamma\delta$ do compartimento intraepitelial do intestino delgado dos animais experimentais.....	63

Figura 11 - Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T e suas subpopulações e linfócitos T $\gamma\delta$ dos linfonodos mesentéricos dos animais experimentais.....	65
Figura 12 - Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T e suas subpopulações e linfócitos T $\gamma\delta$ presentes em placas de <i>peyer</i> do intestino delgado dos animais experimentais.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas experimentais.....	46
Tabela 2 -	Anticorpos monoclonais anti-mouse conjugados com fluorocromos utilizados para análise de populações leucocitárias.....	53
Tabela 3 -	Combinação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos; subpopulações leucocitárias avaliadas e estratégias de análise.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGS	Ácido graxo saturado
AHR	Receptor aril hidrocarboneto
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
AMP	Adenosina monofosfato
APC	Células apresentadoras de antígenos
C	Controle
CCR9	<i>C-C chemokine receptor type 9</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CEE	Coefficiente de eficiência energética
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais
CIPq	Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Controle Pequi
DC	Células dendríticas
DCNT	Doença crônica não transmissível
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
g	Gramas
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GMC	Ganho de massa corporal
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HL	Hiperlipídico
HLP	Hiperlipídico Pequi
IAd%	Índice de Adiposidade Visceral
ID	Intestino delgado
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
kcal	Kilocalorias
kg	Kilogramas

LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LEB	Laboratório de Ensaios Biológicos
LIEs	Linfócitos intraepiteliais
LMN	Linfonodos mesentéricos
LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramas
MPO	Mieloperoxidase
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
NFκB	Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
NLRP3	<i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Óleo de pequi
PAM	Peptídeos antimicrobianos
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato de salina
PP	Placas de Peyer
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
RORγt	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
SFA	Soro fetal bovino
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerois
TCRs	Receptores de células T
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral -α
Treg	T regulatórias
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Obesidade: aspectos epidemiológicos e fisiopatológicos.....	21
2.2	Sistema imune associado à mucosa intestinal – papel da dieta e de compostos dietéticos.....	23
2.2.1	<i>Epitélio intestinal e tecidos linfóides.....</i>	23
2.2.2	<i>Linfócitos intraepiteliais da mucosa intestinal.....</i>	25
2.2.3	<i>Interação dieta/componentes dietéticos vs sistema imune da mucosa intestinal</i>	28
2.3	Modulação imunológica por compostos alimentares.....	32
2.3.1	<i>Ácidos graxos monoinsaturados – MUFA.....</i>	32
2.3.2	<i>Carotenoides.....</i>	33
2.4	Óleo de Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>):valor nutricional e potencial funcional.....	36
3	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	41
4	OBJETIVOS.....	43
4.1	Objetivo geral.....	43
4.2	Objetivos específicos.....	43
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1	Ensaio biológico.....	45
5.1.1	<i>Animais e condições experimentais.....</i>	45
5.1.2	<i>Dietas experimentais.....</i>	45
5.1.3	<i>Protocolo experimental.....</i>	47
5.2	Procedimento de análises.....	48
5.2.1	<i>Indicadores da composição corporal e da ingestão alimentar.....</i>	48
5.2.2	<i>Biomarcadores imunometabólicos sanguíneos.....</i>	49
5.2.2.1	<i>Teste de tolerância intraperitoneal à glicose.....</i>	49
5.2.2.2	<i>Leucograma global.....</i>	50
5.2.3	Análises de imunofenotipagem celular dos tecidos.....	50

5.2.3.1	<i>Coleta dos tecidos.....</i>	50
5.2.3.2	<i>Isolamento das células dos tecidos.....</i>	50
5.2.3.3	<i>Análise ex-vivo de leucócitos do intestino delgado, linfonodo e placa de peyer.....</i>	51
5.2.3.4	<i>Estratégia de análise.....</i>	53
5.3	Análises estatísticas.....	56
6	RESULTADOS.....	57
6.1.1	<i>Ingestão alimentar, antropometria e adiposidade.....</i>	57
6.1.2	<i>Teste de tolerância intraperitoneal a glicose.....</i>	61
6.1.3	<i>Leucograma global.....</i>	62
6.2	Imunofenotipagem de linfócitos do intestino delgado, linfonodo e placas de peyer.....	63
7	DISCUSSÃO.....	67
8	CONCLUSÕES.....	75
9	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, tem aumentado o interesse científico em muitas espécies vegetais exóticas que apresentam composição química peculiar, tanto em nutrientes quanto em compostos bioativos que podem modular a resposta imunológica. Já foi demonstrado alguns alimentos com tais propriedades, dentre eles, o camu-camu (*Myrciaria dubia*) o milho roxo (*Zea mays*), o açaí (*Euterpe oleraceae*) (DESMARCHELIER, 2010) e a jaboticaba (LEITE - LEGGATI *et al.*, 2012).

Entre as diversas espécies exóticas em crescimento no Brasil, o pequi (*Caryocar brasiliense*) é uma árvore típica das regiões de cerrado (COLLEVATTI *et al.*, 2003), que produz um fruto comestível, denominado pequi. O termo “pequi” ou “piquei”, origina-se da língua Tupi-Guarani e significa “fruto de pele espinhosa”, uma referência ao invólucro protetor da semente que é fino e espinhoso (VERA *et al.*, 2007).

O óleo de pequi é extraído da sua polpa. Nutricionalmente, este óleo tem os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) como maiores componentes, aproximadamente 59%, seguidos pelos ácidos graxos saturados (AGS) que representam aproximadamente 41%. O ácido oleico (n18:1), é o seu maior constituinte (~56%) seguido pelo ácido palmítico (~38%; n:16:0) (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Este óleo também é rico em diversos compostos bioativos, dos quais destacam-se os carotenoides (328-420 mg/kg) (OLIVEIRA *et al.*, 2017; TORRES *et al.*, 2016). Dentre os carotenoides encontrados no óleo de pequi destacam-se a anteraxantina, a zeaxantina, a violaxantina e a luteína, mas também apresentam quantidades importantes de β -caroteno, licopeno, criptoflavina, β -criptoxantina, neoxantina dentre outros (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LIMA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Tanto os MUFA quanto os carotenoides tem sido extensivamente associados à proteção contra processos celulares e sistêmicos subjacentes ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como a obesidade (GILLINGHAM; HARRIS-JANZ; JONES, 2011; KRISHNAN, COOPER, 2014; FRENCH *et al.*, 2000; FU *et al.*, 2008; MENNELLA *et al.*, 2015; BONET *et al.*, 2015). No entanto ainda há uma lacuna na literatura sobre investigações de efeitos desses componentes quando presentes em alta concentração em um único alimento. Assim, na última década, o interesse científico no óleo de pequi tem aumentando drasticamente.

Nosso laboratório vem investigando a aproximadamente 8 anos, efeitos biológicos advindos da ingestão da polpa e do óleo de pequi. Nós já demonstramos efeitos advindos da ingestão deste óleo, em modelo animal, sobre o perfil de lipídeos séricos e hepáticos

(TEIXEIRA et al., 2013), a adiposidade visceral, a função cardíaca (CÉSAR et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017;) e a morfologia intestinal (MORENO et al., 2016).

Neste sentido, é nosso interesse investigar também o papel da dieta e de seus componentes na resposta imune, em especial na resposta imune intestinal, já que ela representa nossa primeira linha de defesa em contato direto com os componentes químicos dos alimentos e interage com o metabolismo (FARIA, REIS, MUCIDA, 2017, WANG e SAMPSON, 2009). Assim, recentemente, nosso grupo investigou pela primeira vez, efeitos do óleo de pequi na resposta imune da mucosa intestinal de camundongos, na condição de integridade e na ruptura da integridade, a qual foi induzida pelo modelo agudo de colite ulcerativa. Em conjunto, nossos achados nos permitiram inferir que o óleo de pequi promoveu um aumento da resposta imune reguladora e redução da resposta citotóxica (dados ainda não publicados). No entanto, seus efeitos na resposta imune da mucosa intestinal em ambiente obesogênico ainda não foram investigados.

Sabe-se que a ingestão crônica de dietas hiperlipídicas (obesogênicas), aumenta a permeabilidade da membrana epitelial intestinal, possibilitando a passagem de antígenos e seus produtos, o que compromete a resposta imune (AL-SADI e THOMAS *et al.*, 2007; LUCK *et al.*, 2015). O excesso de ácidos graxos saturados associado a modificações na microbiota residente (BÄCKHED *et al.*, 2004; TURNBAUGH *et al.*, 2006), modificam a composição celular do epitélio intestinal (MONTEIRO-SEPULVEDA *et al.*, 2015), bem como estimulam a resposta do sistema imune associado a mucosa, favorecendo o estabelecimento de inflamação. Por outro lado, dietas ricas em MUFA e antioxidantes, como os carotenoides, podem atenuar o quadro do estresse oxidativo e inflamatório (MURPHY *et al.*, 2015; STORNILOLO *et al.*, 2019), que poderia contribuir para o não estabelecimento da obesidade ou retardar o desenvolvimento de comorbidades, à começar com suas interações com a mucos intestinal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade: aspectos epidemiológicos e fisiopatológicos

Segundo a Organização Mundial da saúde (OMS), a obesidade é definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode conduzir a problemas de saúde (WHO, 2020). Em linhas gerais, ela é o resultado do excesso de ingestão alimentar, uma vez que o aporte de nutrientes necessários para manter o peso corporal estável varia de acordo com o gasto energético. Assim, o consumo excessivo de energia em relação ao gasto energético conduz ao ganho de massa corporal, especialmente de gordura (FIELD, 2014).

A obesidade é considerada um problema de saúde pública. Sua prevalência quase triplicou entre 1975 e 2016. Em 2016, estimou-se que 41 milhões de crianças com menos de 5 anos e 354 milhões com idade entre 5 e 19 anos apresentavam sobrepeso e obesidade. Entre os adultos, mais de 1,9 bilhões, o que corresponde a 39% da população adulta mundial, estavam acima do peso. Aproximadamente 13% desta faixa etária (11% dos homens e 15% das mulheres) eram obesos. Na África, o número de crianças com excesso de peso com menos de 5 anos aumentou quase 50% desde 2000. Quase metade das crianças com menos de 5 anos que estavam com sobrepeso ou obesidade em 2016, viviam na Ásia (WHO, 2018).

No Brasil, segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico – VIGITEL, a prevalência da obesidade aumentou 67,8% em 13 anos, passando de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018. Neste mesmo ano, o crescimento da obesidade foi de 84,2% entre os adultos de 25 a 34 anos, 35 a 44 anos com 81,1%. Embora o excesso de peso seja mais comum entre os homens, em 2018, prevalência da obesidade em mulheres foi 20,7% e nos homens foi de 18,7% (BRASIL, 2019). A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos no mundo estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões, obesos (WHO, 2017).

Em um panorama de saúde pública, a obesidade e outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) tais como doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2, resultam em redução da expectativa de vida e refletem um impacto negativo na economia (CAPUTO *et al.*, 2017). Nos Estados Unidos estima-se que o número de mortes em função dessas patologias seja de aproximadamente 300 mil pessoas. Especula-se que os gastos públicos com o excesso de peso nos países desenvolvidos, seja de 2% a 7% dos orçamentos de saúde (FELIPPE & SANTOS, 2004). No Brasil em 2012, dados apontavam que os custos totais estimados com

todas as morbidades relacionadas ao sobrepeso e à obesidade, chegavam a 2,1 bilhões de dólares no ano (BAHIA *et al.*, 2012).

A etiologia da obesidade é multifatorial, incluindo fatores genéticos, fisiológicos, culturais, ambientais, socioeconômicos e inatividade física (GUPTA *et al.*, 2012; JANS *et al.*, 2017). Esses fatores se relacionam e se potencializam, culminando no ganho de massa corporal e na obesidade ao longo da vida. Ela é considerada uma desordem crônica complexa e que aumenta o risco para várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), particularmente doenças cardiovasculares, diabetes do tipo 2, hipertensão, certos tipos de cânceres, apnéia obstrutiva do sono, osteoartrite (JUNG *et al.*, 2016), contribuindo assim para aumento da morbidade e da mortalidade (CAPUTO *et al.*, 2017).

O mecanismo fisiológico que estabiliza a massa corporal e aparentemente mantém uma proporção adequada de gordura corporal é complexo e não completamente compreendido. Do ponto de vista fisiopatológico, a obesidade é resultante de um balanço energético positivo que culmina com o acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo, especialmente no tecido adiposo branco (TAB) (BACKUS e WARA, 2016).

Morfologicamente, o tecido adiposo (TA) é formado por adipócitos maduros diferenciados, separados entre si por matriz extracelular e pela fração vascular estromal. Esta é constituída, em grande parte, por uma rede de delgadas fibras reticulares formadas principalmente por colágeno tipo III. Nesta porção, são encontrados outros tipos de células, tais como células endoteliais, nervosas e imunocompetentes, especialmente monócitos e/ou macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, células dendríticas e pré-adipócitos (VIEIRA- POTTER, 2014).

O TA é um regulador chave do balanço energético, sendo que o TAB é responsável pelo estoque e distribuição de triacilgliceróis (TAG), e pela síntese e secreção de uma ampla faixa de produtos endócrinos que agem localmente e sistemicamente, já que são lançados na circulação sanguínea (ROMACHO *et al.*, 2014). Os produtos secretados no TAB participam de inúmeros processos celulares, tais como da regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios, do gasto energético e do comportamento alimentar, da inflamação, da adipogênese, da função vascular, da coagulação sanguínea, dentre outros. Além disso, O TA recebe inervações simpáticas e possui uma rede de comunicação neural com os neurônios do sistema nervoso central, bem como com os neurônios do sistema nervoso simpático, recebendo e enviando múltiplos sinais que podem controlar as suas próprias secreções (ARMANI *et al.*, 2010).

De maneira geral, quando a capacidade funcional de estocar gordura do TA é excedida, desordens imunometabólicas são instaladas (BLÜHER *et al.*, 2013). No

desenvolvimento da obesidade, ocorre um remodelamento do TA com infiltração de células imunes, excessiva produção de matriz extracelular (MEC), fibrose, desregulação da produção de adipocinas e desequilíbrio redox que promovem uma disfunção imunometabólica no próprio tecido e em outros tecidos corporais na medida em que caem na circulação sanguínea (SUGANAMI e OGAWA, 2010).

Assim, a base biológica desta doença está fortemente relacionada com uma inflamação de baixo grau, sistêmica e persistente, a qual tem sido indicada como um potencial fator de risco modificável. Neste contexto, tem sido apontado que o sistema imune associado a mucosa intestinal pode exercer papel chave e também funcionar como gatilho no desenvolvimento da inflamação crônica associada à obesidade (COX *et al.*, 2015). Muito se especula sobre a compreensão da influência dietética em processos moleculares, celulares e sistêmicos que possam modular a resposta imune no desenvolvimento e/ou controle da obesidade e suas comorbidades.

2.2. Sistema imune associado a mucosa intestinal – papel da dieta e de compostos dietéticos

2.2.1. Epitélio intestinal e tecidos linfoides.

O primeiro contato de compostos químicos da dieta com o sistema imune é através da mucosa intestinal, especificamente do intestino delgado (ID). Nela está o “sistema imune associado a mucosa intestinal”. Este ambiente fica exposto a uma ampla variedade de antígenos provenientes de alimentos, bactérias residentes e microorganismos invasores (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017). O Sistema imune da mucosa mantém a tolerância aos antígenos bacterianos comensais e alimentares. Essa manutenção é orquestrada pelos sistemas imunológicos inato e adaptativo localizados ao longo da superfície epitelial intestinal e da lâmina própria, que formam a barreira intestinal. (ABREU, 2010).

O sistema imune inato é formado por células epiteliais intestinais, células microfoldadas (M), células de *paneth*, células linfóides inatas, muco e peptídeos antimicrobianos (PAM). O sistema imune adaptativo é composto de células T, células B e seus produtos (ABREU, 2010). A função imunológica do intestino depende, de forma geral, de três componentes, sendo eles a barreira intestinal, o sistema imune (tecido linfóide associado ao intestino – GALT que compreende as placas de *peyer*, linfonodos mesentéricos, células imunes e seus produtos) e a microbiota (GUARNER, 2006).

O epitélio intestinal é a barreira física para a absorção de antígenos e a penetração de patógenos. Existem vários tipos celulares presentes no epitélio, dentre eles as células caliciformes secretoras de muco, as células epiteliais absorptivas secretoras de citocinas, as células M, que fazem apresentação de antígenos e as células de *Paneth*, secretoras de peptídeos antimicrobianos. Todos esses tipos celulares contribuem de diferentes maneiras para a função de barreira da mucosa (MOWAT *et al.*, 2014).

Os linfócitos intraepiteliais residem principalmente na camada epitelial das superfícies mucosas, entre os enterócitos, apresentando características inatas e adaptativas. Apresentam-se com uma frequência de um linfócito a cada 10 células epiteliais intestinais. Por estarem em contato direto com os enterócitos e com os antígenos no lúmen intestinal, estas células participam da resposta imune efetora contra microrganismos patogênicos e também dos processos imunorreguladores na mucosa intestinal. (OLIVARES-VILLAGÓMEZ e VAN KAER, 2018). As grandes maiorias de todos os linfócitos intraepiteliais (LIEs) expressam receptores de células T (TCRs), e esses receptores têm sido o foco principal de estudos sobre a biologia dos LIEs (FAN *et al.*, 2019).

A integridade do epitélio é mantida pelas junções de oclusão (*tigh junctions*), incluindo as *zônulas occludens 1* e as claudinas, que entre outras funções, bloqueiam a passagem de bactérias e de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) através do epitélio intestinal. Os receptores de reconhecimento de padrão (PRR), estimulados pelos PAMPs, podem induzir as células epiteliais, células dentríticas e macrófagos a respostas anti-inflamatórias e antivirais levando a produção de citocinas e quimiocinas. (WINER *et al.*, 2017).

Especificamente na mucosa intestinal encontra-se o GALT, constituído de tecido linfóide denso, representado por folículos linfóides isolados no intestino grosso, ou formando agregados como nas placas de *Peyer* (PP) no íleo (MORITA *et al.*, 2019). As placas de *Peyer* são estruturas não encapsuladas, formadas por agregados de folículos linfóides que sempre tem centros germinativos onde encontram-se os linfócitos B e apresentam linfócitos T em áreas adjacentes. (REBOLDI *et al.*, 2016).

Os antígenos presentes no lúmen são direcionados para o GALT pelo epitélio. Os antígenos, proteínas solúveis, partículas inertes e microrganismos são transportados do lúmen para as PP através das células M. Essas células estão localizadas em regiões do epitélio que recobrem a parte superior das PP e de folículos isolados, permitindo a entrega de antígenos luminiais aos fagócitos mononucleares, tais como células dendríticas (DC) e macrófagos, para, a partir daí, serem transportados para os folículos linfóides e para células B presentes nas PP. Esses eventos desencadeiam respostas imunes específicas ao antígeno, tal como a diferenciação

em plasmócitos e a secreção de IgA (HASE *et al.*, 2009). Além disso, as PP são locais importantes de ativação de linfócitos T (LEE *et al.*, 2008). Portanto, nas PP, há indução de resposta imune adaptativa contra antígenos de origem alimentar captados pelas células M (REBOLDI *et al.*, 2016).

Enquanto as PP apresentam um mecanismo de amostragem de antígenos luminiais através das células M, os linfonodos mesentéricos (LNM) captam antígenos drenados pela linfa dos intestinos delgado e grosso, sendo o local de diferenciação de linfócitos efetores e reguladores. Nos roedores, a linfa do duodeno drena principalmente para um pequeno linfonodo incorporado ao tecido pancreático. O jejuno é drenado para os LNM médios e o íleo distal é drenado para os segmentos distais dos LNM (MOWAT *et al.*, 2014).

Os LNM recebem diversos antígenos provenientes do intestino delgado e do grosso, transportados pela linfa, e possuem algumas funções iguais às do GALT, como diferenciação de linfócitos *naive* em células efectoras (linfócitos T auxiliares e citotóxicos, células T reguladoras e plasmócitos secretores de IgA) a partir da apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (APC). As células que se diferenciam nos LNM em resposta a antígenos migram para a lâmina própria intestinal para atuarem diretamente contra o antígeno cognato.

2.2.2 Linfócitos intraepiteliais da mucosa intestinal

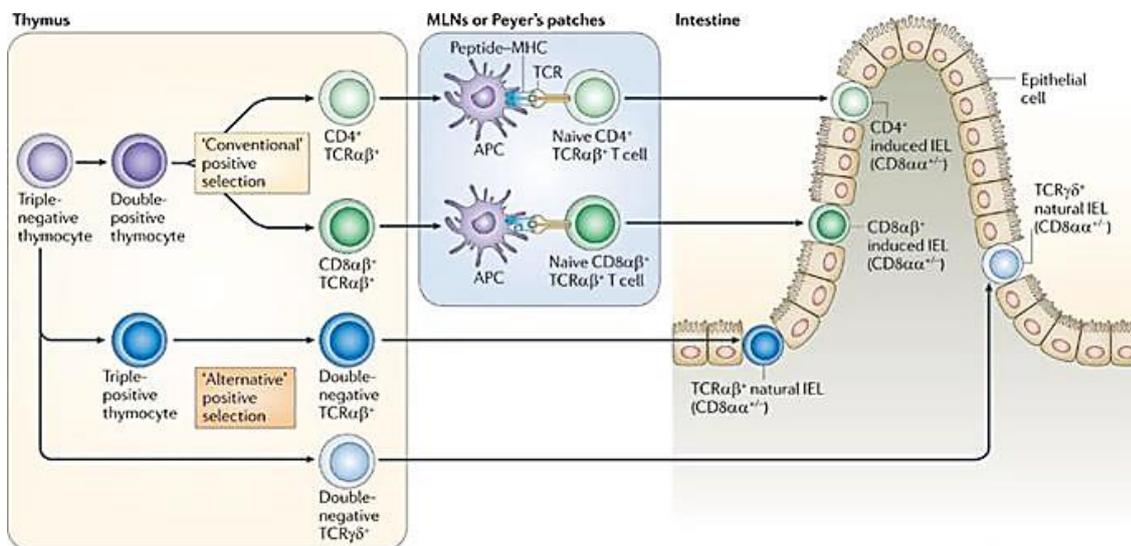
Os linfócitos intraepiteliais são uma população grande e diversificada de células linfoides que residem entre as células epiteliais intestinais que formam a barreira intestinal (OLIVARES-VILLAGOMES e VAN KAER *et al.*, 2018). Estas células estão em contato direto com os enterócitos e com os antígenos no lúmen intestinal e participam da resposta imune inata e adaptativa contra os microorganismos patogênicos e também dos processos imunorreguladores na mucosa intestinal (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011).

Este grupo celular diversificado inclui células linfoides inatas, caracterizadas por alta expressão de marcadores de ativação (CD69 e receptores de ativação e inibição de NK), células de memória residentes em tecidos, linfócitos T citotóxicos regulados por produtos tais como o granzimas B, e receptores anti-inflamatórios ou inibitórios como LAG-3 (DENNING *et al.*, 2007). A maioria, aproximadamente 80%, expressa o fenótipo CD8, com abundantes grânulos citoplasmáticos contendo moléculas citotóxicas, capazes de produzir diversas citocinas (como IFN- γ , IL-2, IL-4 ou IL-17) (SHIRES, THEODORIDIS e HAYDAY, 2001), e

podem expressar na superfície o receptor de antígenos T (TCR/T cell receptor) constituído de cadeias do tipo $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011).

Os linfócitos T intraepiteliais naturais ou tímicos ($CD8\alpha^+$ ou $CD8\alpha^-$ com expressão de $TCR\gamma\delta$ ou $TCR\alpha\beta$) adquirem seu fenótipo ativado durante o desenvolvimento no timo, com antígenos próprios, sendo que o $TCR\alpha\beta$ não expressa $CD4$ ou $CD8\alpha\beta$ (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017). Outro subgrupo são os linfócitos T intraepiteliais induzidos ou periféricos ($CD4^+ \alpha\beta^+$ ou $CD8\alpha\beta^+ TCR\alpha\beta^+$) são a progênie de células T convencionais que foram ativadas, após maturação tímica, em resposta a um antígeno periférico, por células apresentadoras de antígenos nos linfonodos ou placas de *peyer*, tornando-se células efetoras (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011, HAYDAY e GIBBONS, 2008) com maiores proporções de $TCR\alpha\beta^+$ expressando $CD8\alpha\beta^+$ em detrimento ao $CD4^+ \alpha\beta^+$ (FARIA, REIS e MUCIDA, 2017) (FIG. 1).

Figura 1: Diferenciação dos linfócitos intraepiteliais (LIE) naturais e induzidos.



Fonte: Cheroutre, Lambomez e Mucida, (2011).

Os LIEs naturais mais encontrados no ID são os $TCR\gamma\delta^+CD8\alpha^+$ e $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha^+$, que migram logo após o nascimento do timo para a camada epitelial intestinal, onde sua manutenção depende das vias dependentes de T-bet e IL-15 (MUCIDA *et al.*, 2013; KLOSE *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2014). Sua migração para o epitélio parece ser independente da estimulação microbiana (BANDEIRA *et al.*, 1990; MOTA-SANTOS *et al.*, 1990). Os vegetais crucíferos, por exemplo fornecem metabólitos dietéticos ligantes de

receptores de hidrocarbonetos acrílicos, que estão associados com a manutenção de LIE TCR $\gamma\delta$ no epitélio intestinal (LI *et al.*, 2011).

De maneira geral, diante de um desafio imunológico mediado por um patógeno, células do sistema imune inato identificam seu padrão molecular e iniciam a resposta imune. Os linfócitos TCR $\gamma\delta$ participam dessa resposta com funções cruciais na mucosa intestinal, incluindo a manutenção da função da barreira epitelial (promoção do reparo da barreira, controle do crescimento das células epiteliais, secreção de TGF- β), homeostase do tecido e proteção contra patógenos intestinais (produção de citocinas inflamatórias, citotoxicidade). Assim, depois das células epiteliais, os linfócitos T $\gamma\delta$ são a primeira população de células a encontrar os patógenos que invadem a barreira epitelial e estão bem posicionados para responder a compostos alimentares (KOMANO *et al.*, 1995; GUY-GRAND *et al.*, 1998).

Os LIEs induzidos são compostos de células CD4⁺ e CD8⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ maduras que migram para o epitélio intestinal após a ativação em tecidos linfóides secundários (MUCIDA *et al.*, 2013). Essa ativação está associada a atuação de células dendríticas produtoras de TGF- β e ácido retinóico, que induzem a expressão do receptor de quimiocina CCR9 e da integrina $\alpha 4\beta 7$ (homing) (ESTERHAZY *et al.*, 2016; LUDA *et al.*, 2016).

Os LIE TCR $\alpha\beta$ apresentam funções relacionadas à especificidade fenotípica de seus subgrupos. Os linfócitos T CD8 $\alpha\beta$ são mais abundantes no intestino delgado do que no intestino grosso, o que provavelmente está relacionado ao desafio antigênico diferente que enfrentam, desde antígenos alimentares no intestino delgado até antígenos microbianos no intestino inferior (MELGAR *et al.*, 2002). A função primária das células T CD8 ⁺ é eliminar células infectadas ou estranhas liberando perforina e granzima B e secretando citocinas inflamatórias, o que pode contribuir para o desenvolvimento da inflamação. A obesidade aumenta a frequência de células T CD8 ⁺ e induz a expressão de IFN- γ e de granzima B no tecido adiposo (NISHIMURA *et al.*, 2009).

As células TCR $\alpha\beta$ CD4 durante a estimulação crônica podem exibir plasticidade e se transformarem em T regulatórias ou nos diversos subconjuntos de T *helper* (Th) (MCGEACHY *et al.*, 2007; SUGIMOTO *et al.*, 2008). As células da linhagem CD4, como Th1, Th2 e Th17, são capazes de secretar citocinas que possuem variada atividade biológica, além de ativar células B, macrófagos e células dendríticas.

Alguns estudos apontam um papel crucial de componentes dietéticos e da microbiota no estabelecimento normal dos LIE na mucosa intestinal (CHEROUTRE, LAMBOLEZ e MUCIDA, 2011; MENEZES *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 1986). As vitaminas A e D podem atuar na expansão de linfócitos. Camundongos deficientes no receptor de vitamina

D apresentam número reduzido de LIE CD8 α ⁺ e baixos níveis de IL-10, agravando o estado inflamatório (YU *et al.*, 2008). O ácido retinóico secretado pelas células dentríticas é um importante indutor de moléculas que participam do retorno dos linfócitos a lâmina própria e epitélio, como a integrina α 4 β 7 (IWATA *et al.*, 2004).

Assim, sabendo que diferentes compostos alimentares podem modular a permanência dos linfócitos na mucosa, assim como sua expansão e ou induzir o retorno dessas células ao intestino dentre outros processos, torna-se relevante investigar efeitos de diferentes compostos alimentares e alimentos como um todo, sobre os diferentes tipos de LIE, considerando que elas são importantes agentes defensores contra situações diversas.

2.2.3 – Interação dieta/componentes dietéticos vs sistema imune da mucosa intestinal

A dieta e seus componentes podem exercer, na resposta imune intestinal, efeitos homeostáticos ou induzir desequilíbrio, a depender da sua composição e quantidade de componentes no lúmen intestinal. O sistema imune intestinal é fortemente moldado por fatores dietéticos e pela microbiota intestinal, a qual também é dependente da composição da dieta (ROUND e MAZMANIAN, 2009; KISS *et al.*, 2011).

Por exemplo, em padrões dietéticos considerados mais saudáveis e em indivíduos magros, metabólitos microbianos, tais como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato, propionato e o butirato, melhoram a função da barreira intestinal através da modulação da função das células T regulatórias (Treg). Essas células secretam interleucina 10 (IL-10) que, por sua vez, pode aumentar a produção de mucina. A sinalização apical de organismos comensais através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRR) das células epiteliais intestinais estimula a produção de mediadores anti-inflamatórios, especialmente do *transforming growth factor* β (TGF- β), do ácido retinóico (AR) e da linfopietina estromal tímica (TSLP), para promover a tolerância imunológica e a função de barreira (PETERSON *et al.*, 2014).

Produtos derivados de frutas e vegetais, tais como flavonoides e glucosinolatos, ligam-se ao fator de transcrição do receptor aril hidrocarboneto (AHR) e estimulam a função de células imunes, como as células linfoides inatas e células TCD8 α α , que, por sua vez, produzem mediadores que mantêm a integridade da barreira epitelial (KISS *et al.*, 2011).

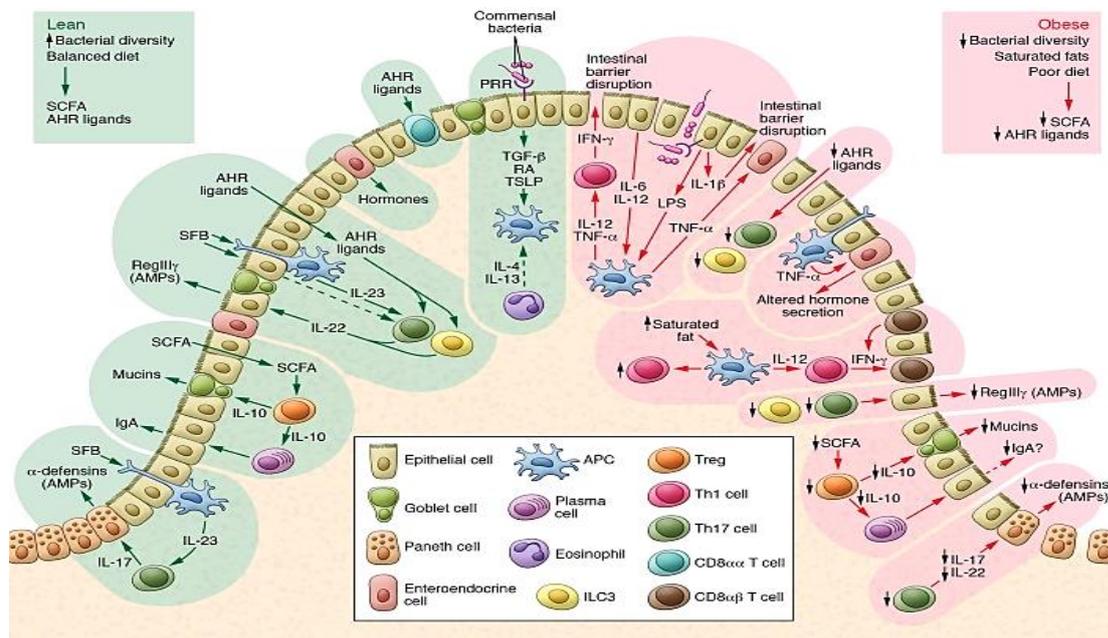
Algumas bactérias comensais, como bactérias filamentosas segmentadas, induzem, preferencialmente, a uma resposta TH17, representada por um subconjunto de células TCD4⁺ que atuam na eliminação de patógenos e na manutenção da função da barreira epitelial devido

a ação de citocinas que elas produzem (IL-17 e IL-22) (IVANOV *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2010). Outras comensais e seus produtos incitam as células T reguladoras a secretar IL-10 e ao aumento da expressão de FOXP3⁺ por estas células (ROUND *et al.*, 2011). Metabólitos bacterianos também influenciam a imunidade, como os ácidos graxos de cadeia curta (como exemplo, o butirato), pois aumentam a diferenciação de células Treg no cólon (FURUSAWA *et al.*, 2013; LUKOVAC *et al.*, 2014).

Por outro lado, na obesidade e em regimes hiperlipídicos, há uma alteração do conteúdo microbiano intestinal conhecido como disbiose. Estudos mostram que a disbiose está associada a um aumento na proporção de Filos *Firmicutes* para *Bacteroidetes* no intestino. Essas alterações vêm sendo associadas ao aumento da captação de energia dos alimentos e ao armazenamento de triacilgliceróis no fígado (BÄCKHED *et al.*, 2004; TURNBAUGH *et al.*, 2006).

A influência bacteriana é importante para a regulação dos principais componentes da barreira, como a produção de mucina, peptídeos antimicrobianos (PAM), e IgA. Durante a disbiose, há uma mudança no perfil de bactérias, o que pode alterar a produção de metabólitos e a função imune da barreira (ROOKS e GARRETT, 2016) (FIG. 2). Pode ocorrer, por exemplo, a redução das bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (LE CHATELIER *et al.*, 2013). Conforme já relatado, os AGCC estão relacionados a manutenção da barreira, promovendo a produção de muco pelas células epiteliais, a expressão de IgA pelas células B, o reparo dos tecidos, a diferenciação de Treg, a integridade epitelial relacionada à interleucinas 18 (IL-18) e à inibição do fator nuclear *kappa beta* (NFκB) (THORBURN, MACIA e MACKAY, 2014; KOH *et al.*, 2016).

Figura 2: Componentes imunológicos do intestino delgado em homeostasia e repercussões no intestino durante a obesidade: aspectos diferenciais.



Fonte: Winer *et al.*, (2017)

O estudo de Le Chatelier *et al.*, (2013) demonstrou que uma baixa contagem de genes bacteriano no DNA fecal, ou seja, baixa riqueza bacteriana, correlacionou-se com a dislipidemia, a resistência à insulina e inflamação, enquanto que a alta contagem se associou com espécies anti-inflamatórias, incluindo *Faecalibacterium prausnitzii*, e a maior produção de butirato.

A mudança do perfil microbiano intestinal e suas repercussões na obesidade estão associadas a dietas ou padrões dietéticos que induzem e sustentam a inflamação e a obesidade. Em geral, essas dietas são hiperlipídicas e ricas em ácidos graxos saturados (AGS), que são capazes de induzir a resposta pró-inflamatória das células imunes (VELDHOEN e BRUCKLACHER-WALDERT; 2012). Eles são capazes de ativar mecanismos de sinalização regulados pelos *toll-like receptors* (TLR), especificamente via os TLR 2 e 4 (TLR2 e TLR4), nos macrófagos para promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias (SHI *et al.*, 2006). Essas dietas também são capazes de reduzir o número de células TCD4⁺ que expressam o fator de transcrição RORγt relacionado a diferenciação em células Th17. Células TCD4⁺ deficientes em RORγt estão relacionadas à indução de intolerância à glicose e da obesidade (GARIDOU *et al.*, 2015).

As dietas hiperlipídicas quase sempre são também ricas em colesterol. Metabólitos do colesterol, como os oxisteróis ou os ácidos biliares, podem ativar receptores nucleares (como

o receptor X no fígado), que também modulam a imunidade intestinal, uma vez que podem inibir a diferenciação das células TCD4⁺ na resposta TH17 (CUI *et al.*, 2011).

Nos padrões dietéticos hiperlipídicos, as alterações nos PAM e citocinas intestinais em função dos estímulos alimentares e microbianos representam uma importante influência na integridade da barreira imunológica. A redução da produção de PAM compromete a permeabilidade da membrana, e das interleucinas 1 β (IL-1 β) e do interferon γ (IFN- γ) no intestino nas dietas hiperlipídicas. Essas citocinas podem piorar a integridade da barreira intestinal pela ativação do NF- κ B que atua promovendo o aumento da permeabilidade das *tight junctions*, (AL-SADI e THOMAS *et al.*, 2007; LUCK *et al.*, 2015).

Com a barreira epitelial comprometida, ocorre também a translocação de produtos bacterianos, como os lipopolissacarídeos (LPS), do intestino para os tecidos (CANI *et al.*, 2008) (FIG. 2). O vazamento de LPS bacteriano através da barreira ativa o sistema imunológico inato e induz à inflamação de baixo grau e disfunções metabólicas (AMAR *et al.*, 2011; CANI *et al.*, 2007). Atualmente, o elo inflamatório mais forte parece estar no jejuno e no íleo do intestino delgado e no cólon proximal, todos associados a altos níveis de organismos comensais (WINNER *et al.*, 2016).

Padrões dietéticos hiperlipídicos também alteram a composição das células imunes adaptativas na lâmina própria do intestino delgado (jejuno distal e íleo) e do intestino grosso. Garidou *et al.* (2015) observaram aumento nas porcentagens de células Th1, além de frequência e número reduzidos de células Th17 no íleo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Em camundongos, Luck *et al.* (2015) também observaram aumento de células Th1, TCD8⁺ e T γ δ em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica, além de redução de células Foxp3 (Treg) em amostras de intestino delgado (Jejuno e íleo) e de cólon de indivíduos obesos em comparação a magros. Em amostras de jejuno, Monteiro-Sepulveda *et al.* (2015) observaram aumento de células TCD3⁺, sendo a maior fração oriunda do compartimento intraepitelial, além de elevação das células TCD8⁺ intraepiteliais, especialmente células TCD8 $\alpha\beta$.

Assim, verifica-se que padrões dietéticos hiperlipídicos, ricos em AGS promovem alterações prejudiciais na resposta imune da mucosa intestinal, sejam elas diretas e, ou em função da disbiose que provocam. Nessa circunstância, ocorre variações no número de células e de seus produtos, implicando em vários processos imunometabólicos que induzem maior permeabilidade da barreira epitelial, invasão de produtos bacterianos e inflamação. Por outro lado, diversos componentes dietéticos podem agir na tentativa de melhorar e, ou, reestabelecer a homeostasia da resposta imune intestinal. Dentre esses compostos, destacam-se os ácidos

graxos monoinsaturados (MUFA) e compostos antioxidantes, abundantes em alimentos de origem vegetal, tais como os carotenoides.

2.3. Modulação imunológica por compostos alimentares

2.3.1. Ácidos graxos monoinsaturados - MUFA

As recomendações de ingestão atuais para ácidos graxos incluem reduções nos AGS, gorduras trans e elevações na ingestão de MUFA e de poli-insaturados (PUFA) (MILLEN *et al.*, 2014). Os MUFA, como os ácidos oleico e palmitoleico, têm sido associados à inúmeros efeitos protetores em processos e imunometabólicos subjacentes às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como redução da agregação plaquetária, regulação da pressão arterial (SCHWINGSHACKL e HOFFMANN, 2012), redução da gordura hepática (BOZZEITO *et al.*, 2012), melhorias na sensibilidade à insulina (CHEN *et al.*, 2013), no perfil lipídico, na regulação do peso corporal (KIEN *et al.*, 2014; QIAN *et al.*, 2016), dentre outros.

No que se refere à resposta imune, enquanto AGS vem sendo associados a respostas pró-inflamatórias, os MUFA e alguns PUFA parecem reduzir a magnitude da resposta inflamatória (MURPHY *et al.*, 2015). Em consonância, há indícios de que a substituição de AGS por insaturados pode atenuar a inflamação crônica, mesmo na obesidade (dieta hiperlipídica em modelo animal ou em obesidade humana) (DISPIRITO e MATHISA, 2015). Assim, é possível que modificações da composição de ácidos graxos dietéticos possam modular benéficamente a resposta imune na obesidade.

Por exemplo, evidências sugerem que, quando fornecidos concomitantemente, os MUFA exercem efeito protetor contra efeitos pró-inflamatórios do ácido palmítico, que é o ácido graxo saturado mais abundante na dieta e em padrões dietéticos hiperlipídicos (IMAMURA *et al.*, 2016). Os mecanismos pelos quais os MUFA podem atenuar a resposta inflamatória induzida pelos AGS envolvem a modulação da microbiota intestinal (PATTERSON *et al.*, 2014; CÂNDIDO *et al.*, 2018), a redução de citocinas pró-inflamatórias (JURADO-RUIZ *et al.*, 2017), a regulação da atividade do inflamassoma 3 (NLRP3) (FINUCANE *et al.*, 2015) e de proteínas plasmáticas (VAN DIJK *et al.*, 2012),

São muitos os estudos que investigaram efeitos de MUFA na resposta imune, tanto *in vitro* quando *in vivo* e em humanos. Van Dijk *et al.* (2012) mostraram que, adultos com sobrepeso ou obesidade que consumiram dieta mediterrânea, rica em MUFA, tiveram uma redução nas proteínas plasmáticas pró-inflamatórias e diminuição na expressão de genes da

fosforilação oxidativa em suas células mononucleares do sangue periférico em comparação àqueles que consumiram dieta rica em AGS. Finucane *et al.* (2015) demonstraram que camundongos alimentados com dieta rica em MUFA, tiveram redução na secreção de IL1 β pelo tecido adiposo, comparados com camundongos alimentados com dieta rica em AGS. Os mesmos autores ainda observaram que o ácido oleico (monoinsaturado) impediu a secreção de IL1 β de células ativadas por lipopolissacarídeos e por AGS.

Adicionalmente, também tem sido apontado a influência dos MUFA na secreção de anticorpos e imunoglobulinas. Em seu estudo sobre os efeitos do óleo de semente de damasco, que contém altos níveis de ácido oleico e linoleico (MUFA), Tian *et al.* (2016) perceberam que o óleo amenizou a imunossupressão induzida por ciclofosfamida, em ratos. Os linfócitos isolados dos animais tiveram maior secreção de imunoglobulinas (Ig): IgM, IgA, IgG além de IL-12, IL-2 e TNF- α . Em um estudo randomizado de três semanas, adultos saudáveis, magros e obesos receberam dietas com alta concentração de ácido palmítico (HPA) e ou baixa concentração de ácido palmítico/alta concentração de ácido oleico (HOP). O grupo HOP apresentou menor secreção de IL-1 β - IL-18, IL-10 e TNF- α por células mononucleares do sangue periférico e baixa expressão de mRNA da proteína 3 que contém os domínios NOD, LRR e pirina (NLRP3) ligada a citocinas pró-inflamatórias, e baixa expressão do mRNA da proteína cJUN no músculo (KIEN *et al.*, 2016).

No que se refere alimentos contendo alta concentração de MUFA, as investigações concentram-se no óleo de oliva, considerado uma das maiores fontes dietéticas desses componentes, especialmente de ácido oleico. Ele tem sido associado à redução da proliferação de linfócitos (DE PABLO *et al.*, 1998; YAQOUB, NEWSHOLME e CALDER, 1994). De Pablo *et al.* (1998) observaram redução na proliferação de linfócitos isolados de baço e estimulados por lipopolissacarídeos, em camundongos Balb/c alimentados com óleo de oliva em comparação aos óleos de girassol ou óleo de coco hidrogenado. Os resultados foram atribuídos ao conteúdo de ácido oleico e compostos antioxidantes do óleo. Jurado-Ruiz *et al.* (2017) acrescentaram óleo de oliva em uma dieta hiperlipídica e observaram diminuição nas concentrações de IL-6 no plasma e de IFN- γ no plasma e tecido adiposo de camundongos.

2.3.2. Carotenoides

Carotenoides são moléculas lipofílicas que tendem a se acumular em compartimentos lipofílicos como membranas ou lipoproteínas. A lipofilicidade destes compostos também influencia a sua absorção, transporte e excreção no organismo (STAHL e

SIES, 2003). Os carotenoides são pigmentos conhecidos por apresentar papel chave em funções fisiológicas, devido às suas propriedades imunoestimulantes e antioxidantes (SURAI *et al.*, 2001).

Os compostos carotenoides apresentam um extenso sistema de ligações duplas conjugadas que podem ser substituídas por grupos terminais, conferindo-lhes atividade antioxidante (PRIOR *et al.*, 2005; MAIANI *et al.*, 2009; GÜLÇIN, 2012). Agem no seqüestro dos radicais peroxila, reduzindo a oxidação dos lipídeos, e desativam o oxigênio singleto. Logo, protegem células e tecidos contra danos dos radicais livres e, ou espécies reativas (BARREIROS e DAVID, 2006).

O papel dos carotenoides na resposta imune vem sendo relatado na literatura já a algum tempo (DAVINELLI *et al.*, 2019; STORNILO *et al.*, 2019; LINNEWIEL *et al.*, 2014; VAN HELDEN *et al.*, 2013). É interessante comentar que, inicialmente, especulava-se que a capacidade imunomoduladora de carotenoides dietéticos era um efeito dos carotenoides pró-vitamina A (BENDICH, 1989). Contudo, tem-se verificado ação específica de carotenoides dietéticos que não apresentam atividade pró-vitamina A, tais como a luteína, a axtaxantina, a β -criptoxantina e o licopeno (CHEW e PARK, 2004, DAVINELLI *et al.* 2019; LIM *et al.*, 2019; STORNILO *et al.*, 2019).

Os resultados dos estudos de Davinelli *et al.* (2019) sugerem que a axtaxantina regula a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-2 em esplenócitos de camundongos BALB/c infectados com *Helicobacter pylori*. Em particular, foi demonstrado que os esplenócitos de camundongos que receberam a maior concentração de axtaxantina produziram mais IFN- γ , IL-10 e IL-2 do que os de camundongos do grupo controle.

Em um estudo com camundongos machos com doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por dieta rica em carboidratos refinados, os autores perceberam que o grupo tratado com β -criptoxantina apresentou aumento da proteína quinase ativada por AMP e diminuiu o gene da citocina IL-6 (LIM *et al.*, 2019).

Storniolo *et al.* (2019) demonstraram em seu estudo *in vitro* que carotenoides presentes em um composto alimentar aumentaram efetivamente a resistência à oxidação de LDL (oxLDL) mediada por Cu^{2+} . O licopeno e o β -caroteno diminuíram, de maneira dependente da sua concentração, a produção de ânion superóxido (O_2^-) e de nitrito (NO_2^-) (indicadores de espécies reativas de oxigênio - ERO e de nitrogênio – ERN) produzidos por macrófagos estimulados por oxLDL.

Carotenoides como o beta caroteno e a luteína (KIM *et al.*, 2011), o licopeno (SIMONE *et al.*, 2011) e a zeaxantina (BIAN *et al.*, 2012) vem sendo associados com interações

na via de sinalização regulada pelo NFkB, de modo a suprimir a produção de produtos pró-inflamatórios como a IL6 e o TNF- α .

Linnewiel *et al.* (2014) em seus estudos com células mamárias cancerígenas T47D e osteoblastos, perceberam que, semelhante ao efeito inibidor de sinalizadores moleculares da resposta inflamatória pela curcumina, derivados de carotenoides atenuaram a fosforilação da Ikb induzida pelo TNF α , reduzindo o efeito pró-inflamatórios do NFkB. Os mesmos autores mediram os efeitos dos derivados de carotenoides na expressão de proteínas endógenas e observaram redução do mRNA de dois genes dependentes do NFkB: o gene do TNF α e do ligante de quimiocina 1 (CCL-1).

Kijlstra *et al.* (2012), administraram luteína intravenosa (1 e 100mg/kg) em ratos, antes da indução da inflamação dos olhos (uveíte) por endotoxinas, os autores observaram redução de algumas citocinas como a IL-6, o TNF α e várias quimiocinas.

Dentre as características químicas pelas quais os carotenoides podem contribuir com a resposta imune está a sua natureza hidrofóbica, que facilita a sua incorporação em diversas membranas e a atividade antioxidante. Alguns modelos experimentais têm demonstrado que as propriedades imunomoduladoras dos carotenoides pode se estender por vários compartimentos corporais. Na mucosa intestinal, os carotenoides parecem exercer funções protetoras.

Alguns carotenoides, como o β -caroteno, são precursores da vitamina A. A vitamina A (ácido retinoico, especificamente) tem função na diferenciação bem como na integridade celular (MUCIDA *et al.*, 2007). Zaiger *et al.* (2004) observaram que animais deficientes em vitamina A apresentaram alterações prejudiciais na morfologia intestinal, comparados a animais suplementados com essa vitamina. O ácido retinoico proveniente de células dendríticas induz receptores intestinais (α 4 β 7-integrina e o receptor de quimiocina, CCR9) nas células T (MEDEIROS *et al.*, 2018), que pode contribuir para o recrutamento dessas células para o endotélio vascular da lâmina própria (BAKDASH *et al.*, 2015).

Estes relatos demonstram o grande potencial imunomodulador de carotenoides e seus derivados, instigando ainda mais os estudos destes compostos. As investigações com esses compostos são quase sempre realizadas, em sua forma isolada ou extraída de alimentos, existindo assim, uma lacuna em investigações de efeitos advindos da ingestão de alimento ricos nesses compostos.

2.4 Óleo de Pequi (*Caryocar brasiliense*): valor nutricional e potencial funcional

O pequi pertence à família *Caryocaraceae* e compreende 25 espécies divididas em dois gêneros (*Caryocar* e *Anthodiscus*) (ASCARI *et al.*, 2013). Algumas espécies do gênero *Caryocar* são conhecidos como pequi, piqui, piquiá e piqui-vinagreiro (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). No que tange a etimologia do fruto, originário da língua Tupi-Guarani, o termo “pequi” ou “piqui” significa “fruto de pele espinhosa”, uma referência ao invólucro protetor da semente que é fino e espinhoso (VERA *et al.*, 2007). A espécie *Caryocar coriaceum* cresce na região nordeste do Brasil e seus frutos são conhecidos como piqui. Piquiá é a denominação popular para os frutos da espécie *Caryocar villosum*, que cresce na região amazônica e o *Caryocar brasiliense* é a espécie que cresce na região centro-oeste do Brasil e em partes de Minas Gerais sendo seus frutos conhecidos como pequi (COSTA *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O pequi (*C. brasiliense*) é composto por um epicarpo verde (camada externa), um mesocarpo externo (polpa branca, não comestível) e um mesocarpo interno (parte comestível, amarelo claro, polpudo, rico em óleo) que inclui uma camada de endocarpo fino e rígido com espinhos e um caroço branco também chamado de semente, noz ou amêndoa (FARIA-MACHADO *et al.*, 2015). Essa espécie apresenta variadas aplicações desde a indústria da madeira, produção de sabão, comércio, cosméticos, cozinha regional a medicina popular (OLIVEIRA *et al.*, 2017). A polpa (mesocarpo interno) pode ser usada na preparação de sucos, sorvetes, geléias e licores dentre outros. A amêndoa é usada como ingrediente culinário em bolos, condimentos ou consumida fresca (TORRES *et al.*, 2016; ASCARI *et al.*, 2013; ASCARI *et al.*, 2010; ROELSER *et al.*, 2008).

Tanto a polpa quanto a amêndoa são, costumeiramente, usados como fonte de óleo comestível e para fins terapêuticos pela população regional para tratar, por exemplo, lesões de feridas, doenças respiratórias, dores musculares, artrite crônica, tumores, doenças gástricas e inflamatórias (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2011; DA SILVA QUIRINO *et al.*, 2009; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2008). Alguns desses efeitos têm sido investigados (COLOMBO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2011, DA SILVA QUIRINO *et al.*, 2009) e vem sendo atribuídos ao seu alto conteúdo de MUFA e compostos antioxidantes, como carotenoides (AGUILAR *et al.*, 2011; ROESLER *et al.*, 2008).

O óleo de pequi é extraído da sua polpa e tem os MUFA como maiores componentes, aproximadamente 59%, seguidos pelos AGS, aproximadamente 41%. O ácido oleico (n18:1), é o seu maior constituinte (~56%) seguido pelo ácido palmítico (~38%; n:16:0) de natureza saturada (Oliveira *et al.*, 2017). Este óleo também é rico em diversos compostos

bioativos, dos quais destacam-se os carotenoides (328-420 mg/kg) (OLIVEIRA *et al.*, 2017; TORRES *et al.*, 2016). Dentre os carotenoides encontrados no óleo de pequi destacam-se a anteraxantina, a zeaxantina, a violaxantina e a luteína, mas também apresentam quantidades importantes de β -caroteno, licopeno, criptoflavina, β -criptoxantina, neoxantina dentre outros (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LIMA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Assim, diante do uso terapêutico popular, da diversidade nutricional e de compostos bioativos presentes no pequi, sua polpa e óleo tem sido alvo de pesquisas e já foi associado a diversos efeitos benéficos.

Jorge *et al.* (2019) na administração oral de doses de 700 e 1000 mg/kg de óleo de pequi a camundongos com edema de pata induzido por carragenina perceberam efeito anti-edematogênico e antinociceptivo nos animais. Os autores atribuíram a diminuição no edema de pata aos efeitos antioxidantes do óleo de pequi já relatados na literatura.

A atividade anticarcinogênica também foi alvo de estudos. Miranda-Vilela *et al.* (2014) observaram contenção no crescimento tumoral, além de aumento na imunidade dependente de linfócitos em camundongos *Swiss* com indução de tumor sólido de Ehrlich e tratados com 30 mg de óleo de pequi. Palmeira *et al.* (2016) induziram câncer hepático em camundongos Balb/c com 14 dias de idade e ofertaram duas doses diárias de óleo de pequi (100 ou 400 mg/kg) a partir dos 30 dias por 25 semanas consecutivas. Os autores observaram que o volume total de lesões e adenomas foi reduzido em 51% no grupo tratado com 400 mg/kg de óleo de pequi.

A atividade antioxidante do óleo de pequi também tem sido destacada. Vale *et al.* (2019) investigaram a suplementação de 400mg de óleo de pequi a ratos *Wistar* na proteção de células hepáticas contra lesões resultantes do estresse oxidativo decorrente do exercício físico. Os resultados demonstraram efeito protetor nos hepatócitos do grupo suplementado.

Yamaguchi *et al.* (2017) avaliaram a liberação de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS tratados com extratos da polpa do *Caryocar villosum* em diferentes concentrações. O extrato hidroetanólico da polpa na concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu quase 100% da produção de óxido nítrico.

Ratos com lesão hepática aguda induzida por tetracloreto de carbono (CCL4) e tratados com 3 ou 6 ml/kg de óleo de pequi por 21 dias, tiveram lesões hepáticas mais leves e níveis mais altos da lipoproteína de alta densidade (HDL), aumento de atividade das enzimas glutaciona peroxidase e glutaciona redutase no fígado quando comparados com o grupo não tratado com o óleo de pequi (LUCILLIA *et al.*, 2016).

Colombo *et al.* (2015) encontraram uma redução significativa no estresse oxidativo e proteção contra os danos no DNA quando administraram 15µl de óleo de pequi a 40 camundongos Balb/c com danos no DNA e estresse oxidativo induzido por uretano.

Investigações sobre a influência do óleo de pequi no sistema imune ainda são escassas na literatura. Estudos sobre a atividade anti-inflamatória deste óleo despontam timidamente com investigações acerca da influência desse alimento sobre a atuação de leucócitos, neutrófilos, produtos inflamatórios e produção de citocinas.

Jorge *et al.*, (2019) testaram a capacidade anti-inflamatória desse óleo. Em seu estudo, os autores administraram por via oral 1000 mg/kg de óleo a camundongos *Swiss* machos e observaram a inibição de 73% ($p < 0,05$) da migração de leucócitos totais para a pleura inflamada dos camundongos (pleurisia) em comparação aos animais controle.

Roll *et al.* (2018) na administração de 30 mg/dia de óleo de pequi a camundongos *Swiss* fêmeas observaram aumento significativo de linfócitos e diminuição de neutrófilos e monócitos nos animais de 11 a 12 meses. Os autores atribuíram o resultado a uma imunomodulação positiva pelo óleo de pequi uma vez que, tanto em humanos quanto em animais, a imunidade dependente de linfócitos (respostas imunes humorais e celulares) diminui com o avanço da idade (AHMEAD *et al.*, 2009). Os neutrófilos têm sido apontados como os principais efetores da inflamação aguda, além de contribuir para condições inflamatórias crônicas e respostas imunes adaptativas e ainda facilitar o recrutamento de monócitos em locais de tecidos inflamados (KOLACZOWSKA e KUBES, 2013). Assim, especulou-se que os efeitos do óleo de pequi no aumento de linfócitos (%) e na diminuição de neutrófilos e monócitos (%) na faixa etária de 11 a 12 meses desempenhou um efeito protetor contra a inflamação crônica de baixo grau relacionada ao envelhecimento.

No estudo de Lucillia *et al.* (2016) já citado anteriormente, também foi observado redução das concentrações circulantes de leptina e de mediadores inflamatórios como IL-6, leucotrienos 4 e 5 e do TNF α no grupo tratado com óleo de pequi em comparação ao grupo não tratado.

O óleo do *Caryocar coriaceum* reduziu significativamente o edema de pata de ratos *Wistar* induzido por carragenina em doses diferentes administradas durante sete e 15 dias comparado ao grupo tratado com solução salina. Esses mesmos pesquisadores testaram ainda a capacidade antioxidante *in vitro* do óleo de *Caryocar coriaceum* e perceberam a redução da liberação de mieloperoxidase (MPO), das células polimorfonucleares. (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2016). A MPO é uma enzima constituinte dos grânulos de neutrófilos, também encontrada em certos monócitos e macrófagos teciduais. Essa enzima catalisa a formação de inúmeras

espécies reativas, contribuindo para a resposta imune inata e para danos nos tecidos durante a inflamação (FU *et al.*, 2001).

Estudos prévios, *in vivo*, do nosso grupo de pesquisa, têm demonstrado alguns efeitos da polpa e do óleo de pequi sobre marcadores do metabolismo, da adiposidade e cardiovasculares, assim como a capacidade antioxidante sistêmica e tecidual. Nossos estudos apontaram benefícios da sua ingestão sobre o perfil de lipídeos séricos (TEIXEIRA *et al.*, 2013), sobre a deposição hepática de gordura e estrutura intestinal (MORENO *et al.*, 2016) e sobre a adiposidade visceral e função cardíaca de ratos saudáveis ou alimentados com dieta ocidental (OLIVEIRA *et al.*, 2017; CÉSAR *et al.*, 2017). Recentemente, mostramos em camundongos com colite ulcerativa induzida por DSS que o óleo de pequi foi capaz de atenuar a resposta imune da mucosa intestinal, retardando e atenuando os efeitos da agressão causada pelo DSS à mucosa dos animais (dados não publicados).

3. JUSTIFICATIVA

De maneira geral, esta proposta se justifica diante das seguintes premissas:

- A obesidade é uma epidemia global e tem como processo celular subjacente, uma disfunção imuno metabólica que leva à inflamação crônica de baixo grau, a qual está associada ao desenvolvimento de comorbidades;
- A mucosa intestinal, é um dos primeiros contatos de antígenos alimentares com o sistema imune, que em condições homeostáticas, mantém um controle sobre a resposta de tolerância a esses antígenos e à microbiota hospedeira;
- A ingestão crônica de dietas hiperlipídicas (obesogênicas), aumenta a permeabilidade da membrana epitelial intestinal, possibilitando a passagem de antígenos e seus produtos, o que compromete a resposta imune;
- Excesso de ácidos graxos saturados associado a modificações na microbiota residente, modificam a composição celular do epitélio intestinal, bem como estimulam a resposta do sistema imune associado a mucosa;
- Evidências científicas apontam diversos efeitos imunomoduladores de compostos da dieta, sejam nutrientes ou não, *in vitro*, em modelos animais e humanos. Dentre estes, destacam-se MUFAs e os carotenoides;
- As investigações com esses compostos são quase sempre realizadas, em sua forma isolada ou extraída de alimentos, existindo assim, uma lacuna em investigações de efeitos advindos da ingestão de alimento rico nesses compostos;
- O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) é um alimento popularmente consumido e apresenta alto conteúdo de MUFAs e carotenoides;
- Trabalho recente do nosso grupo de pesquisa mostrou potencial efeito imunossupressor do óleo de pequi na mucosa intestinal de camundongos magros e acometidos pela colite ulcerativa aguda (dados ainda não publicados);
- São ausentes na literatura, investigações sobre os efeitos do óleo de pequi na resposta imune da mucosa intestinal em modelo de obesidade induzida por dieta.

A hipótese do estudo é de que a ingestão crônica do óleo de pequi na dieta hiperlipídica altera o fenótipo de células do sistema imune associado a mucosa intestinal.

3. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar efeitos da ingestão crônica do óleo de pequi em elementos da resposta imune da mucosa intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar indicadores relacionados à composição corporal e à ingestão alimentar;
- ✓ Avaliar biomarcadores imunometabólicos sanguíneos;
- ✓ Determinar o fenótipo de linfócitos do compartimento intraepitelial da mucosa do intestino delgado e de órgãos linfoides.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Ensaio biológico

O óleo de pequi utilizado no ensaio biológico foi adquirido no comércio local de Diamantina-MG e mantido sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) em frasco de vidro, ao abrigo da luz até o momento da sua utilização.

5.1.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados 48 camundongos C57BL/6 machos, com peso médio inicial de $24 \pm 2\text{g}$, adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG. O experimento foi conduzido no Laboratório de Ensaio Biológicos (LEB) do Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em sala climatizada ($22\text{-}24^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas invertido ao ciclo regular. Os animais foram mantidos, manipulados e eutanasiados de acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/index.html). O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais da UFVJM – CEUA/UFVJM. (Protocolo n 039/2016).

4.1.2 Dietas experimentais

Foram formuladas dietas purificadas, tendo como base as recomendações do *American Institute of Nutrition (AIN93)* (REEVES *et al.*, 1993) e as fórmulas D12450J e D12492 da *Research Diets Inc.* As dietas foram rotuladas em: dieta controle (C); dieta controle + óleo de pequi (CP); dieta hiperlipídica (HL) e dieta hiperlipídica + óleo de pequi (HLP). A dieta C teve composição balanceada de acordo com REEVES *et al.* (1993). A dieta HL teve a composição ajustada para tornar-se com elevado teor de lipídeos provenientes da banha de porco (60% das calorias totais), conforme a *Research Diets Inc.*

A dieta CP foi preparada de modo a conter menos 33,9 gramas de óleo de soja por quilograma de dieta, o que representou a quantidade de óleo de pequi a ser ingerida, também por quilograma de dieta. Na dieta HLP, a quantidade de banha de porco foi reduzida em 47,7 g

por quilograma de dieta, pela mesma razão. A composição das dietas experimentais está na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais

Ingredientes(g/kg)	Dietas experimentais*			
	C	CP	HL	HLP
Caseína	200,0	200,0	261,8	261,8
Amido dextrinizado	132,0	132,0	163,6	163,6
Sacarose	100,0	100,0	90,1	90,1
Amido de milho	397,5	397,5	0,0	0,0
Óleo de soja	70,0	36,1	32,7	32,7
Banha de porco	0,0	0,00	320,7	273,1
Celulose microfina	50,0	50,0	65,4	65,4
Mix mineral	35,0	35,0	45,8	45,8
Mix vitaminas	10,0	10,0	13,1	13,1
L-cistina	3,0	3,0	3,9	3,9
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,6	2,6
Óleo de pequi **	0,0	33,9	0,00	47,7
Macronutrientes Kcal%	C	CP	HL	HLP
Proteínas	20,3	20,3	20,0	20,0
Carboidratos	63,8	63,8	19,4	19,4
Lipídeos	16,0	16,0	60,7	60,7
Densidade calórica Kcal/g	3,9	3,9	5,2	5,2

* C = Dieta baseada nas recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN93G) (REEVES et al., 1993) e na fórmula D12450J; CP = dieta C acrescida de óleo de pequi na proporção de 33,9 g/kg em substituição ao óleo de soja, HL = dieta hiperlipídica baseada na fórmula D12492 (Research Diets Inc); Dieta HLP = dieta HL acrescida de óleo de pequi (HLP) na proporção de 47,7 g/kg em substituição a banha de porco. ** Valores totais do óleo de pequi para uma dieta de 1000g que foram oferecidos em porções de 150mg homogeneizadas em uma grama das respectivas dietas.

O óleo de pequi não foi diretamente acrescentado nas dietas CP e HLP. Essas dietas foram formuladas com menos 33,9g de óleo de soja 47,7g de banha de porco por quilograma de dieta, para ambas CP e HLP, respectivamente, de modo que o óleo de pequi foi ofertado em doses diárias de 150 mg, homogeneizadas em um pellet de dieta. A formulação das dietas foi executada a cada quilograma. Assim, a quantidade de lipídeos retirada da dieta C foi menor que da dieta HL porque os animais C comem mais que os animais HL, portanto comem 1 quilograma de dieta em menos tempo que os HL.

A quantidade diária de óleo de pequi ingerida pelos animais foi determinada a partir da estimativa de ingestão de duas porções de gorduras (oleaginosas e óleo) por humanos, considerando uma ingestão calórica diária de 1800 Kcal. Duas porções de gordura equivalem a 16g ou 144kcal, as quais correspondem a 8% de gordura em uma dieta de 1800kcal. Esta proporção foi aplicada à ingestão calórica diária dos camundongos. Para tal, em estudo anterior do nosso grupo com as mesmas dietas, estimou-se uma média diária de ingestão calórica de 17,49 Kcal/dia para grupo controle e 16,47 Kcal/dia para grupo hiperlipídico. Assim, 8% dessas calorias correspondeu a 155 mg e 146 mg de óleo de pequi, respectivamente. Adotou-se, para efeito de padronização 150mg/dia.

5.1.3 Protocolo experimental

O experimento teve duração de 10 semanas. Antes do seu início, os animais foram alojados individualmente em caixas de polipropileno (425 x 266 x 155 mm, 820 mm²), no ambiente experimental por uma semana para se adaptarem às condições ambientais.

No primeiro dia do experimento, eles foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, conforme as dietas: grupo controle (C), que recebeu a dieta controle, grupo controle óleo de pequi (CP) que recebeu dieta controle e óleo de pequi, grupo hiperlipídico (HL), que recebeu dieta hiperlipídica e grupo hiperlipídico pequi (HLP), que recebeu dieta hiperlipídica e óleo de pequi (FIG. 3). Os animais foram mantidos individualmente nas caixas durante todo o protocolo experimental.

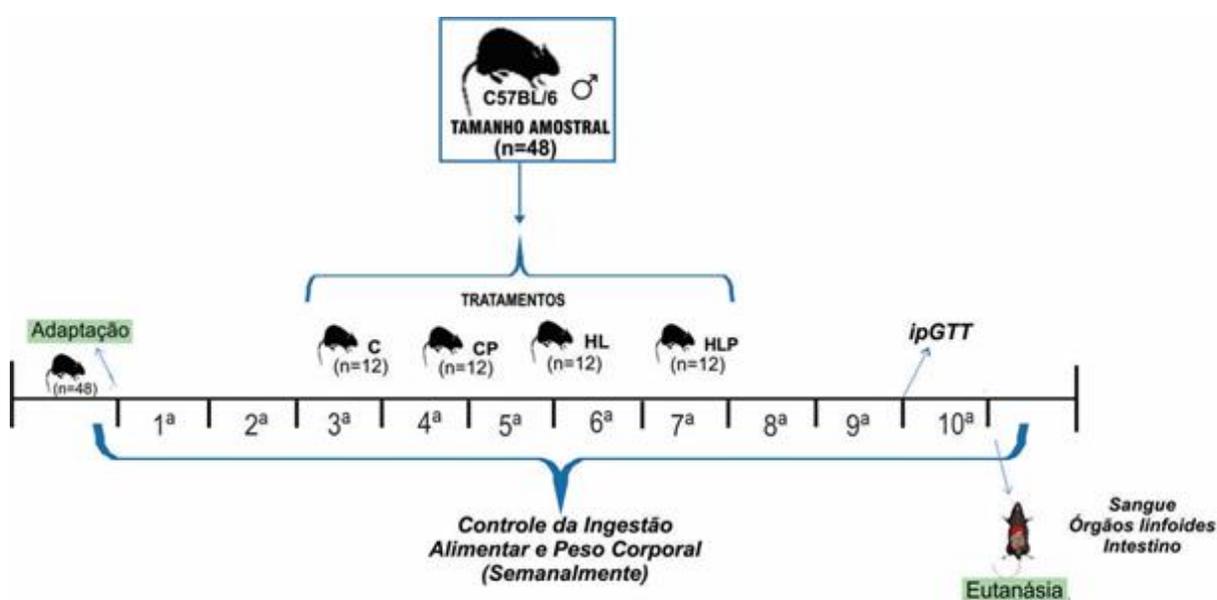
O óleo de pequi foi, então, ofertado diariamente, para cada animal dos grupos CP e HLP em um *pellet*. Para tal, o óleo de pequi foi previamente aquecido a 40 °C por aproximadamente 20 minutos, as 150 mg foram pesadas em balança analítica e homogeneizadas em aproximadamente 1 g de dieta, formando um *pellet*. Cada *pellet* foi formulado individualmente e congelado. Durante o protocolo, os *pellets* foram retirados aproximadamente meia hora antes da oferta aos animais.

Para tanto, em cada caixa, antes da oferta do *pellet* contendo óleo de pequi, a dieta foi retirada e, em seguida, somente o referido *pellet* foi ofertado de modo a assegurar a ingestão total do óleo de pequi. Em seguida (após ingestão total), a dieta foi novamente ofertada. Os grupos C e HL também passaram pelo mesmo procedimento diário, porém recebendo um *pellet* semelhante, contendo apenas a respectiva dieta.

Todos os animais tiveram acesso livre às dietas experimentais e à água filtrada durante todo o protocolo. A ingestão alimentar e a massa corporal foram monitoradas semanalmente. Na nona semana foi realizado o teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT).

Ao final da décima semana, após 12 horas de jejum, todos os animais foram eutanasiados por decapitação após anestesia com solução de quetamina/xilazina (60/10 mg/kg de peso corporal). Foram coletados, o sangue, o tecido adiposo visceral (retroperitoneal, epididimal e mesentérico) e o intestino delgado, os quais foram processados para análises posteriores.

Figura 3: Esquema ilustrativo do protocolo experimental



* C = Dieta baseada nas recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN93G) (REEVES et al., 1993) e a fórmula D12450J; CP = dieta C adicionada de óleo de pequi na proporção de 33,9 g/kg em substituição ao óleo de soja, HL = dieta hiperlipídica baseada na fórmula D12492 (Research Diets Inc); Dieta HLP = dieta HL acrescida de óleo de pequi (HLP) na proporção de 47,7 g/kg em substituição a banha de porco. ipGTT: Teste de tolerância intraperitoneal a glicose.

5.2. Procedimentos de análises

5.2.1. Indicadores da composição corporal e da ingestão alimentar

As massas corporais dos animais foram aferidas semanalmente em balança semi-analítica. O ganho de massa corporal (GMC) foi calculado ao final do experimento, subtraindo-se a massa corporal final da massa corporal inicial.

A ingestão alimentar absoluta (g) foi aferida pela pesagem da dieta ofertada e das sobras (g ofertadas – g sobras = g ingeridas). Em seguida, foi calculada a ingestão alimentar média diária (ingestão alimentar total dividida pelo número de dias do experimento). A ingestão calórica total foi obtida multiplicando-se a ingestão alimentar total pela densidade calórica de cada dieta e em seguida a ingestão calórica média diária também foi obtida pela divisão da ingestão calórica total pelo número de dias do experimento.

A ingestão lipídica (g/dia) foi obtida multiplicando-se a quantidade de lipídeos (g) presente e uma grama de dieta pela ingestão média diária. A ingestão calórica lipídica (kcal/dia) foi obtida multiplicando-se a quantidade em calorias de lipídeos em uma grama de dieta pela ingestão média diária.

A eficiência em transformar calorias consumidas em massa corporal foi determinada por meio do coeficiente de eficiência energética (CEE), expresso em %, utilizando a equação:

$$CEE = [\text{ganho de massa corporal total (g)} / \text{ingestão calórica total (kcal)}] * 100$$

As massas absolutas das gorduras epididimal, retroperitoneal e mesentérica foram utilizadas para o cálculo do índice de adiposidade visceral - IAd% (BOUSTANY *et al.*, 2004), conforme a equação:

$$IAd = [(\text{massa da gordura epididimal} + \text{massa da gordura retroperitoneal} + \text{massa da gordura mesentérica}) / (\text{massa corporal final} - \sum \text{massa da gordura epididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{mesentérica})] \times 100$$

5.2.2 Biomarcadores imunometabólicos sanguíneos

5.2.2.1. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

O teste de tolerância intraperitoneal à glicose foi realizado ao final da nona semana de tratamento. Após jejum de seis horas, os animais receberam uma solução de dextrose a 20%, via intraperitoneal (1mg/kg de massa corporal) em solução salina (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2015). Amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda no jejum (minuto 0) e nos minutos 15, 30, 60 e 120 após a injeção da solução de dextrose (MORTON *et al.*, 2001).

A concentração sanguínea de glicose foi medida por meio de corte na ponta da cauda com medidor portátil de glicose (Roche, Accu-Chek Performa Nano, Rio de Janeiro, Brasil). A partir desses dados foi plotada curva da concentração sanguínea de glicose em função

do tempo e calculou-se a área sob da curva. Quanto menor a área sob a curva maior a tolerância à glicose.

4.2.2.2. *Leucograma global*

Para a análise de leucócitos totais, o sangue foi diluído na proporção de 1:20 em líquido de Turk. Após 5 minutos 10µl da solução foi analisada na câmara de Neubauer e os leucócitos foram contados em contador automático de células CELM CC-550[®] (CELM, Barueri, SP, Brasil).

4.2.3. **Imunofenotipagem celular dos tecidos - linfonodos mesentéricos, placas de *peyer* e compartimento intraepitelial do intestino delgado**

5.2.3.1 *Coleta dos tecidos*

Os linfonodos mesentéricos foram retirados e colocados em solução salina fosfato contendo 0,1% de albumina de soro bovino (PBS-BSA 0,1%) a 4°C. Em seguida, o intestino delgado foi retirado, as placas de *peyer* foram removidas da porção serosa do intestino e receberam o mesmo tratamento que os linfonodos. Foram obtidos aproximadamente cinco a sete placas de *peyer* por animal. O intestino delgado foi aberto longitudinalmente e transferido para uma placa de petri contendo tampão A, composto por solução de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution-HBSS) livre de Ca^{2+}/Mg^{2+} , tampão HEPES (25Mm) e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) para remover o conteúdo fecal.

5.2.3.2 *Isolamento das células dos tecidos*

*A) Linfonodos mesentéricos (LMN) e placas de *peyer**

Após serem retirados, os linfonodos mesentéricos tiveram a gordura adjacente removida, e assim como as placas de *peyer*, foram cuidadosamente macerados com o auxílio da porção fosca de lâminas histológicas. O conteúdo celular de ambos os compartimentos foi peneirado em peneira de malha com calibre 70µM (*cell strainer*), para a obtenção da suspensão de células únicas. As suspensões celulares foram lavadas duas vezes em PBS-BSA 0,1% e a viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão por azul de Trypan, procedimentos conforme Deitch, Xu e Qi (1990). A concentração final foi ajustada para 1×10^7 células/mL em PBS-*Wash* para os linfonodos e 1×10^6 células/mL em PBS-*Wash* para as placas de *peyer*.

B) Compartimento intraepitelial do intestino delgado.

Os linfócitos foram isolados dos compartimentos intraepiteliais conforme Souza *et al.*, (2016) com algumas modificações para se obter somente os linfócitos intraepiteliais (LIE). O intestino, cortado longitudinalmente, foi lavado três vezes com 10 ml de tampão A (HBSS livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, tampão HEPES (25Mm) e 5% SFB) em placa de petri com auxílio de uma pinça e em seguida, foi cortado em pedaços de aproximadamente 0,5 cm e transferidos para um tubo falcon de 50 mL contendo 15 ml de tampão A. Com o intuito de remover o muco, o tubos falcon foram submetidos ao vortex vigorosamente por 15 segundos e o sobrenadante foi peneirado em peneira de aço inox com malha de 1mm e descartado. Posteriormente, foi adicionado ao intestino mais 15 ml de tampão A e o processo se repetiu duas vezes e o sobrenadante descartado.

Posteriormente, foi adicionado o tampão B (Hanks livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 2Mm de ácido etilenodiamino tetra-acético-EDTA e 25Mm de tampão HEPES) aos cortes do intestino em um tubo falcon. Esses tubos foram submetidos ao vortex vigorosamente por aproximadamente 30 segundos e a solução foi peneirada novamente e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi adicionado ao tecido o tampão C (Hanks livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 15Mm de tampão HEPES, 5Mm de EDTA, 10% SFB e 0,015% de α -ditiotreitól-DTT) e submetidos ao vortex. O tecido imerso em tampão C foi transferido para garrafas de cultura e mantidos no homogeneizador (Shake SI300, Lab companion), a 37°C, 67 rpm por 15 minutos. Após serem novamente submetidos ao vortex, o sobrenadante foi coletado em tubo cônico de 50ml e o tecido descartado.

A suspensão de células em tampão C foi centrifugada a 400x g durante 6 minutos a 4°C. Após, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso em 10 ml de PBS-BSA 0,1%. Posteriormente, o sobrenadante contendo linfócitos, debris e células mortas foram filtrados através de peneira com malha de calibre 70 μM , para obtenção de suspensão de células únicas. A suspensão de células foi centrifugada a 400x g durante 6 minutos a 4°C duas vezes e a viabilidade celular foi verificada pelo método de exclusão por azul de Trypan. A concentração final de células do intestino delgado foi ajustada para 1×10^6 células/mL em PBS-Wash.

5.2.3.3 Análise ex-vivo de leucócitos do intestino delgado, linfonodos e placas de peyer

Para as análises dos marcadores de superfície dos linfócitos isolados dos linfonodos mesentéricos, placas de peyer e do compartimento intraepitelial do intestino delgado foram utilizados 1 μl de anticorpos monoclonais específicos para os receptores celulares de leucócitos

totais, linfócitos T, linfócitos T auxiliares (Th), linfócitos T citotóxicos e linfócitos T $\gamma\delta$ respectivamente CD45, CD3, CD4, CD8 e TCR $\gamma\delta$, incubados com 50 μ l de suspensão de células de todos os compartimentos, a saber: 5x10⁵ células dos linfonodos e placas de peyer, e 5x10⁴ células do intestino delgado, durante 30 minutos a 4°C, ao abrigo de luz. A análise dos marcadores de superfície foi realizada pelo método de imunofluorescência recomendado pela Becton Dickinson (BD, San Diego, CA-USA).

Após a incubação, as suspensões de células foram lavadas duas vezes, primeiro com 1ml de PBS e depois com 2 ml de PBS e centrifugadas a 300x g, a 18°C durante 7 minutos após cada lavagem. As marcações para TCR $\gamma\delta$, CD4 e CD8 receberam tratamento diferente uma vez que os anticorpos anti- TCR $\gamma\delta$, - CD4 e - CD8 eram biotinizados. Assim, após a primeira lavagem com 1ml de PBS, foram acrescentados 5 μ l de Streptoavidina conjugada com Ficoeritrina (PE) diluída em PBS (1:250) para TCR $\gamma\delta$ e 10 mL de Streptoavidina conjugada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) diluída em PBS (1:200) para CD4 e CD8. As soluções foram incubadas por 30 minutos e, em seguida, lavadas com 2 mL de PBS e centrifugada.

As células dos linfonodos e placas de peyer foram ressuspensas em 0,1 mL de PBS e 0,1 mL de tampão de fixação PBS-Paraformaldeído 4%. As células do intestino delgado foram ressuspensas em 0,2 mL de PBS e 0,1 ml de tampão de fixação PBS-Paraformaldeído 4%. Em seguida, prosseguiu-se com a análise no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II® - Beckton Dickinson, San Jose, CA, EUA) em um intervalo de tempo de no máximo 24 horas.

As amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros fenotípicos celulares a fim de quantificar o percentual de diferentes marcadores em linfócitos, indicando a frequência de células de interesse nas diversas subpopulações estudadas. Foram adquiridos por tubo aproximadamente 30000, 40000 e 50000 eventos totais para as placas de peyer, linfonodos e compartimento intraepitelial do intestino delgado respectivamente. Os dados foram analisados usando o software FlowJo, version 10.0.6 (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Os anticorpos utilizados para a identificação das populações leucocitárias foram conjugados com os APC/cy7, Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) e Ficoeritrina (PE). O anticorpo anti- TCR $\gamma\delta$ foi conjugado com biotina e para este foi utilizado uma Streptoavidina conjugada com PE. Os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 também foram conjugados com biotina e para estes foram utilizados Streptoavidinas conjugadas com FITC. Os anticorpos e suas especificidades estão listados na tabela 2.

Tabela 2. Anticorpos monoclonais anti-mouse conjugados com fluorocromos utilizados para análise de populações leucocitárias.

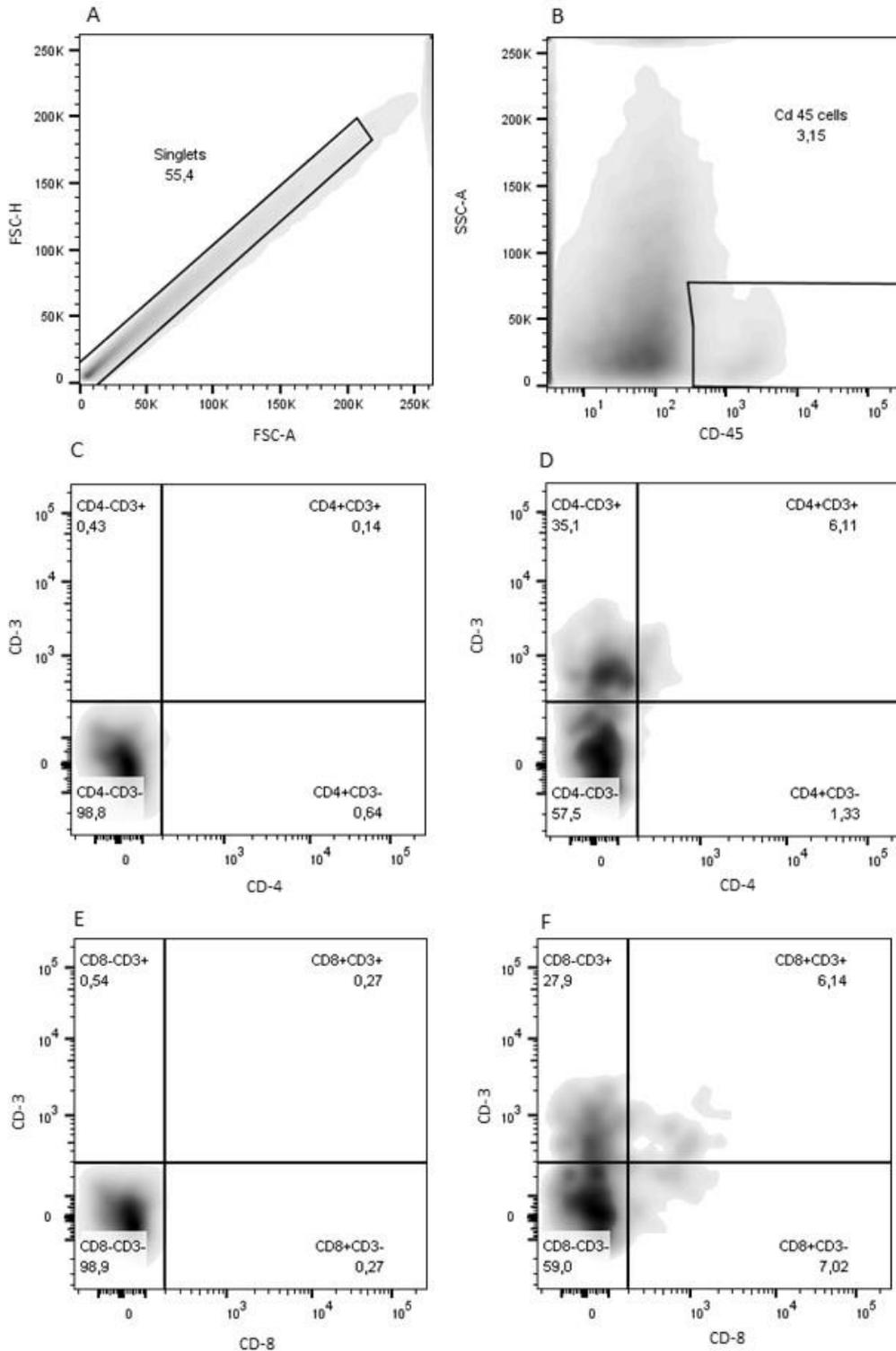
Anticorpos	Marca	Especificidade
Anti-CD45-APC-cy7	Biolegend	Leucócitos
Anti-CD3 PE	Biosciences USA	Linfócitos T
Anti-CD4 FITC <i>Biotin</i>	Biosciences USA	Linfócitos Th
Anti-CD8 FITC <i>Biotin</i>	Biosciences USA	Linfócitos T citotóxicos
Anti TCR $\gamma\delta$ <i>Biotin</i>	Biosciences USA	Linfócitos T $\gamma\delta$

4.2.3.4. Estratégia de análise

Para análise dos dados, primeiramente, foi feito um gráfico de distribuição de pontos, com os eixos “tamanho pelo pico da área” e “tamanho pelo pico de altura” (FSC-A x FSC-H). Nesse gráfico foi selecionada a população de células únicas (*singlets*), com um *gate* sobre essa população. A partir dessa população foi plotado um novo gráfico de granulosidade (SSC) pela fluorescência da população de leucócitos totais (CD45) e foi feito um *gate* sobre esta população de células. A partir desse *gate* os gráficos posteriores foram plotados.

Para análise do percentual de linfócitos T totais em relação ao total de leucócitos e percentual de Linfócitos T auxiliares dentro do total de Linfócitos T foi feito um gráfico conforme as marcações com anticorpos anti CD3 x anti CD4. Para análise do percentual de linfócitos T citotóxicos dentro Linfócitos T as marcações foram anti-CD3 e anti-CD8. A partir das populações de células não marcadas com anticorpos foi estabelecido o que seriam as populações marcadas, utilizando *gates* de quadrantes. Os dados obtidos em cada quadrante dos gráficos de dispersão corresponderam aos valores percentuais da população selecionada nos gráficos de dispersão SSC x Anti-CD45. A estratégia de análise está especificada na Figura 4.

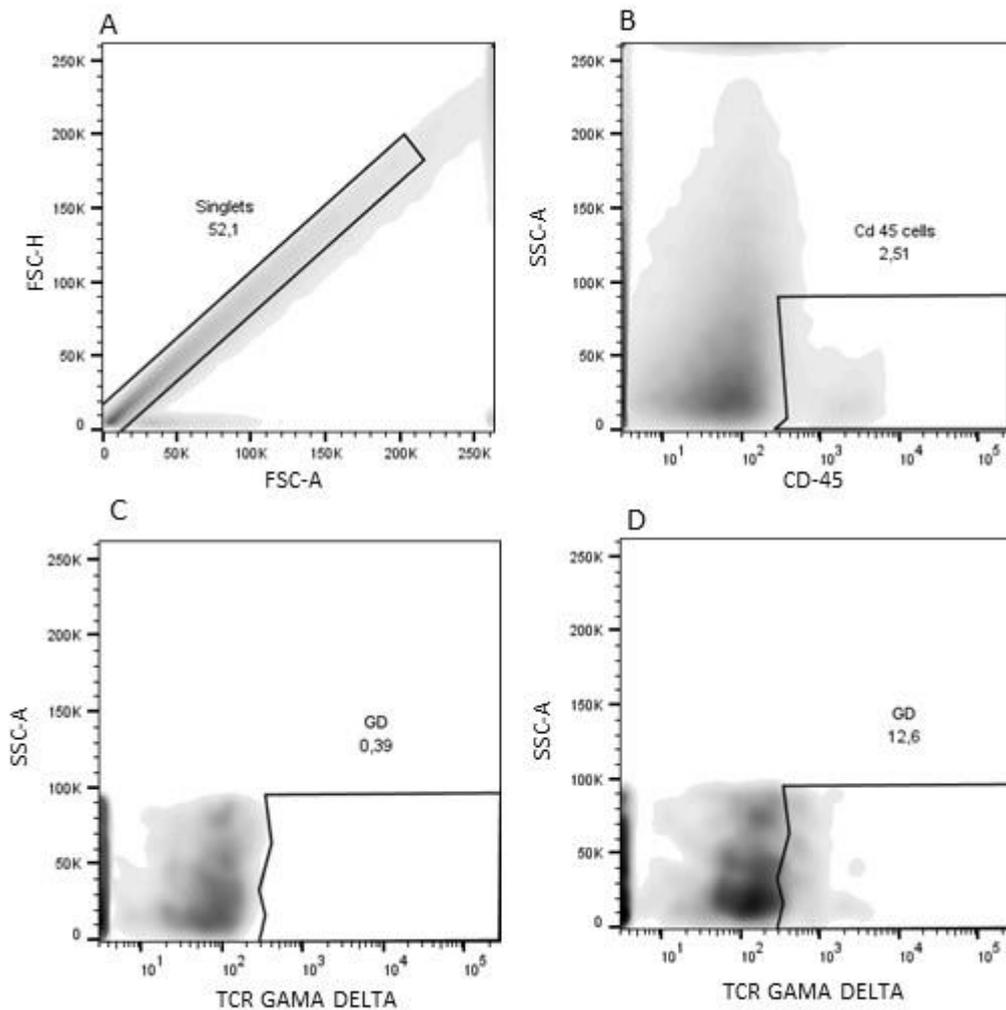
Figura 4. Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo*



*Gráficos de dispersão pontual são usados para seleção de singlets (A). Em seguida são utilizados gráficos SSCxAnti-CD45, para seleção de leucócitos (B). As células não marcadas são delimitadas por um gate de quadrantes nos gráficos Anti-CD3xAnti-CD4 (C) para percentual de células T Totais e Células Th e AntiCD3xAntiCD8 (E) para percentual de células T citotóxicas. Esses mesmos gates são utilizados para delimitar as populações de células marcadas (D e F)

Para a obtenção dos percentuais de linfócitos $T\gamma\delta$, após seleção dos leucócitos foram plotados gráficos de dispersão de granulosidade x fluorescência do anticorpo TCR $\gamma\delta$ Biotin-Streptoavidina-PE (Stp-PE). Da mesma forma, a partir das populações de células não marcadas com anticorpos foi estabelecido o que seriam as populações marcadas utilizando um gate. A estratégia de análise está especificada na figura 5.

Figura 5. Sequência de procedimentos utilizados para a análise dos percentuais de Linfócitos $T\gamma\delta$ por citometria de fluxo.



Gráficos de dispersão pontual são usados para seleção de singlets (A). Em seguida foi utilizado gráfico SSCxAnti-CD45, para seleção de leucócitos (B). E por fim foi utilizado gráfico SSCxAnti- TCR $\gamma\delta$ -Stp-PE para seleção percentual de células $T\gamma\delta$ (D) após delimitação das células não marcadas (C).

As combinações de anticorpos para detecção de cada população celular estão descritas na Tabela 3:

Tabela 3: Combinação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos; subpopulações leucocitárias avaliadas e estratégias de análise.

APC –cy7	PE	Stp-FITC	Stp-PE	Subpopulações analisadas
CD 45	CD3			% leucócitos e linfócitos Totais
CD 45	CD3	CD4		% linfócitos T auxiliares
CD 45	CD3	CD8		% linfócitos T citotóxicos
CD45			TCR- $\gamma\delta$	% linfócitos T $\gamma\delta$

5.3 Análise estatística

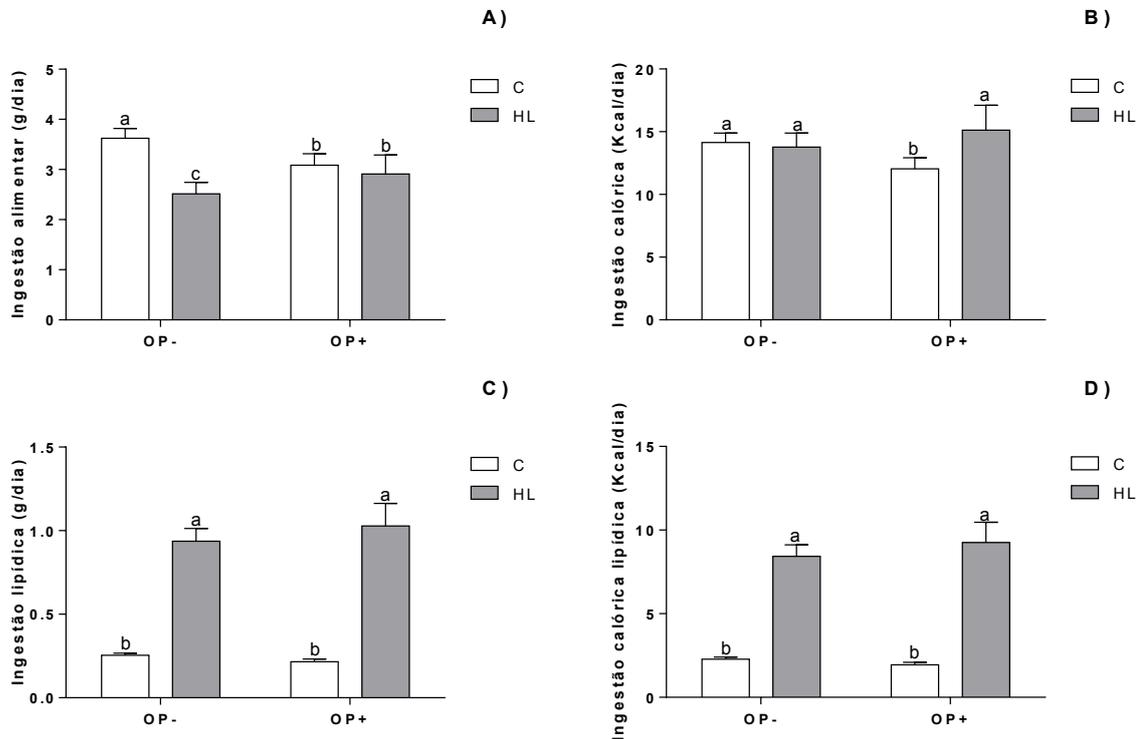
O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram expressos em médias \pm desvio padrão, salvo indicação em contrário. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre os grupos de tratamentos, quando atestada a normalidade dos dados, foi utilizada análise de variância com duas fontes de variação - dieta x óleo de pequi (*Two way*- ANOVA) e teste Tukey, *a posteriori* sempre que necessário. No caso dos dados não paramétricos utilizou-se análise Kruskal-Wallis e o teste de Dunns *a posteriori*, quando necessário. Para tal, foi utilizado o software Prisma versão 6.01 e adotado $p < 0,05$ como nível de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Ingestão alimentar, antropometria e adiposidade

A ingestão alimentar diária dos grupos HLP ($2,91 \pm 0,38$) e CP ($3,08 \pm 0,22$) foi igualmente menor que a do grupo C ($3,62 \pm 0,19$) e ambas superiores à do grupo HL ($2,51 \pm 0,23$; $p < 0,05$) (Fig. 6A). O grupo CP ($12,03 \pm 0,89$) apresentou menor ingestão calórica que o grupo HLP ($15,13 \pm 1,98$) e este, se igualou aos grupos C e HL ($14,513 \pm 0,75$ e $13,78 \pm 1,11$) (Fig. 6B). A ingestão lipídica diária dos grupos HLP e HL ($1,02 \pm 0,13$ e $0,93 \pm 0,07$) foi igualmente superior à dos grupos C ($0,25 \pm 0,01$) e CP ($0,21 \pm 0,01$) ($p < 0,05$) (Fig. 6C). O mesmo resultado foi observado para a ingestão calórica lipídica (HLP= $9,25 \pm 1,21$; HL= $8,43 \pm 0,68$; C= $2,28 \pm 0,12$ e CP= $1,94 \pm 0,14$). ($p < 0,05$) (Fig. 6D).

Figura 6. Efeitos do óleo de pequi na ingestão alimentar e calórica de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

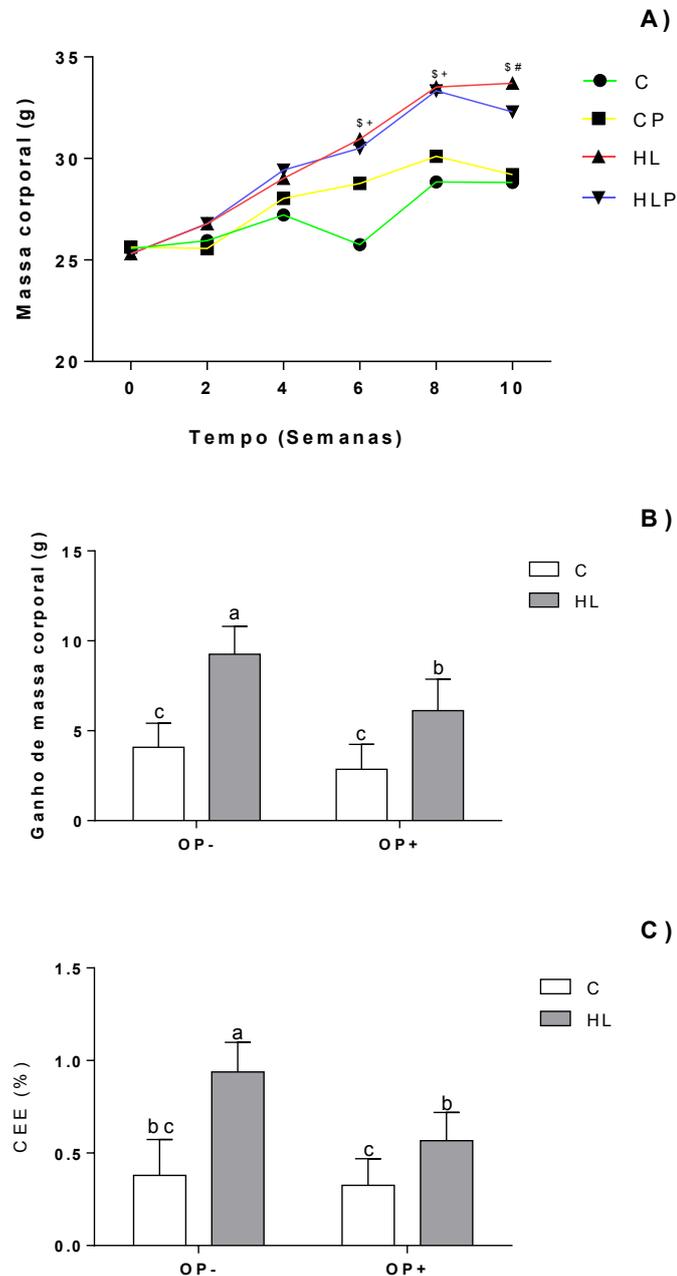


Ingestão alimentar diária (A), Ingestão calórica diária (B), Ingestão lipídica diária (C), ingestão calórica lipídica diárias (D). C= dieta controle; HL = dieta hiperlipídica; OP- = grupos tratados com dietas C e HL sem óleo de pequi; OP+ = grupos tratados com dietas C e HL e 150mg/dia de óleo de pequi (CP e HLP). Valores expressos em média \pm desvio padrão. N = 10 animais por grupo experimental. Barras acompanhadas de letras diferentes, diferem entre si por Two-way ANOVA e teste Tukey; $p < 0,05$.

No início do experimento as massas corporais dos animais eram homogêneas (C=25,49±0,49g, CP=24,92±0,38g, HL=25,20±0,24g, HLP=25,24±0,58g) (Fig. 7A). Todos os animais ganharam massa corporal de forma semelhante até a quarta semana. Na sexta semana, as massas corporais dos animais HL e HLP foram igualmente superiores às dos grupos C e CP ($p<0,05$). Entre a oitava e a décima semana, houve uma perda de massa corporal no grupo HLP em relação ao HL (aproximadamente 7%), embora essa diferença não tenha sido significativa (Fig. 7A). A massa corporal do grupo HLP também se igualou aos grupos C e CP (Fig. 7A). No ganho de massa corporal, os animais do grupo HLP ganharam menos massa (6,11±1,75) em relação ao grupo HL (9,26±1,54g), embora ainda superior aos animais dos grupos C (4,08±1,33g) e CP (2,85±1,38g) ($p<0,05$; Fig. 7B).

O maior CEE foi o do grupo HL (0,93±0,15%; $p<0,05$). O grupo HLP (0,56±0,15%) teve o CEE maior que o CP (0,32±0,14%) e igual ao C (0,37±0,19%) ($p<0,05$; Fig. 7C).

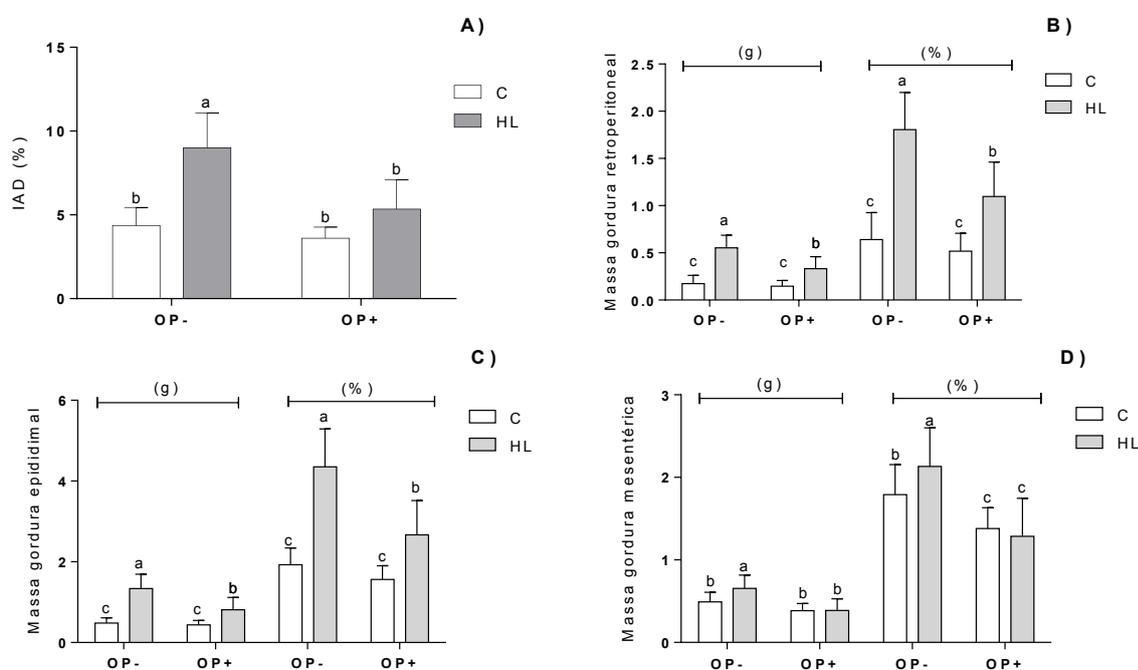
Figura 7. Efeitos do óleo de pequi na massa corporal e na eficiência energética de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.



Evolução da massa corporal (A), ganho de massa corporal final (B), Coeficiente de eficiência energética (C) dos animais experimentais. C= dieta controle; HL = dieta hiperlipídica; OP- = grupos tratados com dietas C e HL sem óleo de pequi; OP+ = grupos tratados com dietas C e HL e 150mg/dia de óleo de pequi (CP e HLP). Valores expressos em média \pm desvio padrão. N = 10 animais por grupo experimental. \$ indica diferença do grupo HL vs grupo C; + indica diferença do grupo HLP vs grupo C, # indica diferença do grupo HL vs CP. Barras acompanhadas de letras diferentes, diferem entre si por Two-way ANOVA e teste Tukey; $p < 0,05$.

Os animais do grupo HLP ($5,34 \pm 1,79\text{g}$) apresentaram o IAd% menor do que os animais do grupo HL ($9,01 \pm 2,06\text{g}$) e igualaram-se aos animais dos grupos C ($4,36 \pm 1,08\text{g}$) e CP ($3,60 \pm 0,66\text{g}$) ($p < 0,05$; Fig. 8A). Em relação aos compartimentos isolados, observamos que a gordura retroperitoneal pesou menos para o grupo HLP em relação ao HL, tanto em peso absoluto quanto relativizado em relação à massa corporal (HLP = $0,33 \pm 0,12\text{g}$ e $1,09 \pm 0,36\%$; HL = $0,55 \pm 0,13\text{g}$ e $1,80 \pm 0,39\%$; $p < 0,05$), e não se igualou aos grupos C ($0,17 \pm 0,08\text{g}$ e $0,64 \pm 0,28\%$) e CP ($0,14 \pm 0,06\text{g}$ e $0,51 \pm 0,18\%$; Fig. 8B). O mesmo foi observado para a gordura epididimal (HLP = $0,81 \pm 0,30\text{g}$ e $2,66 \pm 0,84\%$, HL = $1,33 \pm 0,35\text{g}$ e $4,35 \pm 0,94\%$, CP = $0,43 \pm 0,11\text{g}$ e $1,56 \pm 0,33\%$, C = $0,48 \pm 0,12\text{g}$ e $1,92 \pm 0,41\%$; Fig. 8C). No caso da gordura mesentérica, a ingestão do óleo de pequi (HLP) reduziu sua massa absoluta em relação ao HL (HLP = $0,38 \pm 0,14\text{g}$ e HL = $0,65 \pm 0,16\text{g}$) a ponto de igualar aos grupos C e CP (C = $0,49 \pm 0,11$ e CP = $0,38 \pm 0,08\text{g}$; $p < 0,05$, Fig. 8D). Quando relativizada, sua massa foi ainda menor que a do grupo C ($p < 0,05$; Fig. 8D).

Figura 8: Índice de adiposidade visceral e massas absolutas (g) e relativizadas pela massa corporal (%) da gordura dos compartimentos retroperitoneal, epididimal e mesentérico de camundongos alimentados com dieta balanceçada e hiperlipídica contendo ou não óleo de pequi



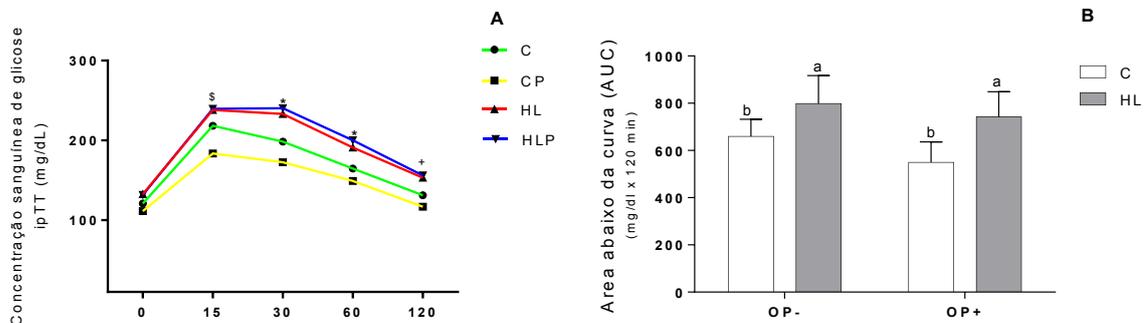
Índice de adiposidade visceral (A), Massa da gordura retroperitoneal (g e %) (B); Massa da gordura epididimal (g e %) (C) e Massa da gordura mesentérica (g e %) (D). C = Dieta controle; HL: Dieta hiperlipídica. OP- = grupos tratados com dietas C e HL sem óleo de pequi. OP+ = grupos tratados com dietas C e HL e 150 mg/dia de óleo de pequi (CP e HLP). Valores expressos em média \pm desvio padrão. N = 10 animais por grupo experimental. Barras acompanhadas de letras diferentes, diferem entre si por Two-way ANOVA e teste Tukey; $p < 0,05$.

6.1.2 Tolerância intraperitoneal a glicose

No teste de tolerância intraperitoneal à glicose, observamos, de maneira geral, concentrações de glicose nos grupos HL e HLP mais altas do que nos grupos C e CP ao longo do teste ($p < 0,05$). Nos primeiros 15 minutos os animais do grupo CP ($183,6 \pm 24,18$) apresentaram menor concentração sanguínea de glicose do que os animais dos grupos C ($218,20 \pm 29,46$); HLP ($239,70 \pm 29,43$) e HL ($238,10 \pm 25,77$; $p < 0,05$). O mesmo resultado foi observado ao final do teste (CP= $116,90 \pm 16,16$, C= $131,20 \pm 12,30$; HL= $153,30 \pm 17,45$ e HLP= $156,0 \pm 16,59$; $p < 0,05$) (Fig. 9A).

Em consonância, na análise da área sob a curva, observamos menor área para o grupo CP ($549,55 \pm 87,06$) em relação aos grupos HL= $798,50 \pm 118,20$; HLP= $742,05 \pm 107,01$. Apesar de também ter sido ligeiramente menor que o grupo C, esta diferença não foi significativa. Houve uma ligeira redução da AUC para o grupo HLP em relação ao grupo HL, mas essa diferença não foi significativa. Por outro lado, apesar de esta área, em valores absolutos, ter sido ligeiramente superior ao grupo C, esta diferença também não foi significativa (Fig. 9B).

Figura 9. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose dos animais experimentais.



(A) Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (TTOG) realizado no final da 9ª semana após os tratamentos especificados. (B) Área sob a curva (AUC) do teste de tolerância intraperitoneal à glicose durante 120 minutos após os tratamentos especificados. C = Dieta controle; HL: Dieta hiperlipídica. OP- = grupos tratados com dietas C e HL sem óleo de pequi. OP+ = grupos tratados com dietas C e HL e 150 mg/dia de óleo de pequi (CP e HLP). Valores expressos em média \pm desvio padrão. N = 10 animais por grupo experimental. § indica diferença de CP vs C, HL, HLP. * indica diferença de C vs HL, com ou sem óleo de pequi. + indica diferença entre CP vs HL e HLP. Barras acompanhadas de letras diferentes, diferem entre si por Two-way ANOVA e teste Tukey; $p < 0,05$.

6.1.3. Leucograma global

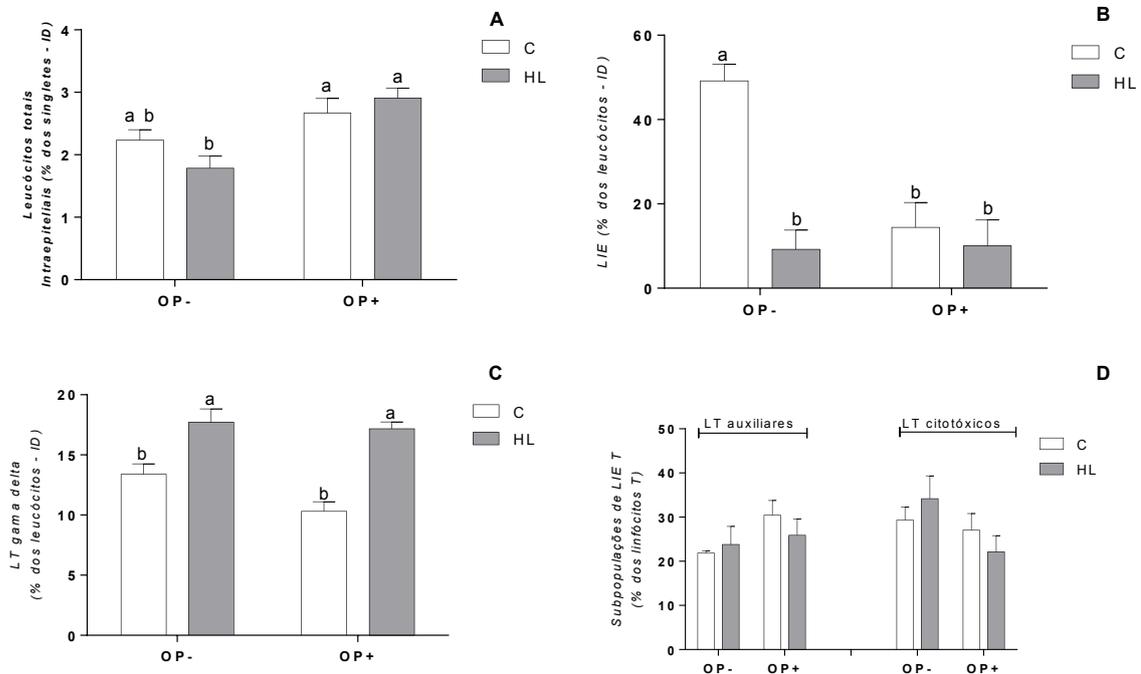
A ingestão de óleo de pequi na dieta controle (CP = $875,00 \pm 131,07$), em valores absolutos, reduziu a contagem de leucócitos totais no sangue em relação ao grupo C ($1390 \pm 159,13$), porém essa diferença não foi significativa. Não houve diferenças significativas nas demais comparações (HL = $1690,00 \pm 342,11$; HLP = $1770,00 \pm 243,72$).

6.2 Imunofenotipagem do compartimento intraepitelial do intestino delgado e de órgãos linfóides

Na figura 10 pode ser observado o perfil fenotípico celular em compartimento intraepitelial da mucosa intestinal. Os grupos HLP e CP apresentaram elevação no percentual de leucócitos totais (CD45+) em relação ao grupo HL ($p < 0,05$), e foram similares ao grupo C (Fig. 10A). Com relação ao perfil de linfócitos totais (CD45+CD3+) foi observado uma diminuição em sua porcentagem nos grupos HLP, HL e CP com relação ao grupo C ($p < 0,05$) (Fig. 10B).

Observamos também uma porcentagem de linfócitos $T\gamma\delta$ (CD45+TCR $\gamma\delta$ +) igualmente superiores nos grupos HL e HLP, comparados com os grupos C e CP ($p < 0,05$; Fig. 10C). As subpopulações de linfócitos, a saber, linfócitos T auxiliares (CD45+CD3+CD4+) (Fig. 10D) e linfócitos T citotóxicos (CD45+CD3+CD8+) (Fig. 10E) não foram alteradas nem em função da dieta hiperlipídica nem do óleo de pequi (Fig. 10D).

Figura 10 Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T e suas subpopulações e de linfócitos $T\gamma\delta$ do compartimento intraepitelial do intestino delgado dos animais experimentais



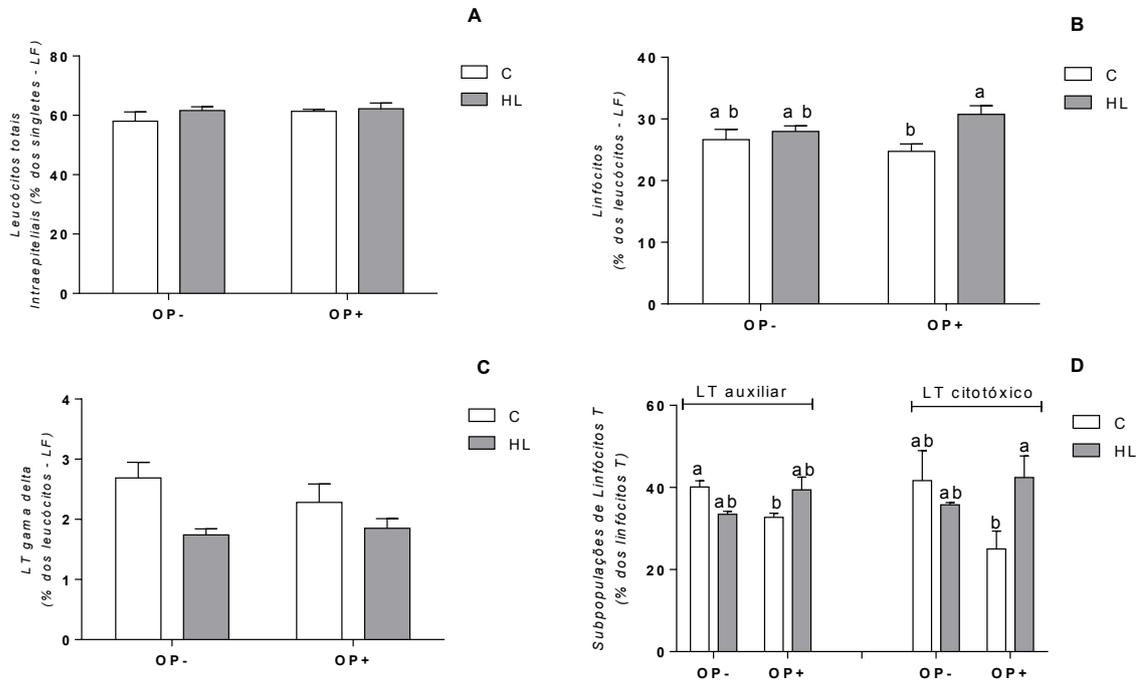
C = Dieta controle; HL: Dieta hiperlipídica. OP- = grupos tratados com dietas C e HL sem óleo de pequi. OP+ = grupos tratados com dietas C e HL e 150 mg/dia de óleo de pequi (CP e HLP). Valores expressos em média \pm erro padrão. N = 7 animais por grupo experimental. Barras acompanhadas de letras diferentes, diferem entre si por Two-way ANOVA e teste Tukey; $p < 0,05$.

Nos linfonodos mesentéricos (Fig. 11), não houve diferenças para os leucócitos totais (Fig. 11A) entre os grupos experimentais. Em valores absolutos, a dieta hiperlipídica promoveu um ligeiro aumento no percentual de linfócitos totais no grupo HLP comparado aos grupos C e HL. Entretanto, essas diferenças não foram significativas (Fig. 11B). Não houve diferenças significativas para os linfócitos $T\gamma\delta$ entre os grupos experimentais (Fig. 11C). Porém, vale ressaltar que essas células tiveram uma redução de aproximadamente 50% no grupo HL em relação ao C. A ingestão de óleo de pequi pelo grupo HLP não alterou esse achado (Fig. 11C).

Um menor percentual de linfócitos T auxiliares foi verificado no grupo CP com relação ao grupo C ($p < 0,05$) (Fig. 11D). As alterações observadas nos grupos hiperlipídicos não foram significativas quando comparadas ao grupo C (Fig. 11D). No entanto vale ressaltar que a ingestão de óleo de pequi na dieta hiperlipídica (HLP) promoveu, em valores absolutos, uma elevação de 15% nesses linfócitos em comparação ao grupo HL (Fig. 11D).

Em valores absolutos, o grupo controle que ingeriu óleo de pequi (CP) teve uma redução percentual de 53,43% de linfócitos T citotóxicos em relação ao grupo C. Entretanto, essa diferença foi significativa (Fig. 11D).

Figura 11 Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T e suas subpopulações e linfócitos $T\gamma\delta$ dos linfonodos mesentéricos dos animais experimentais

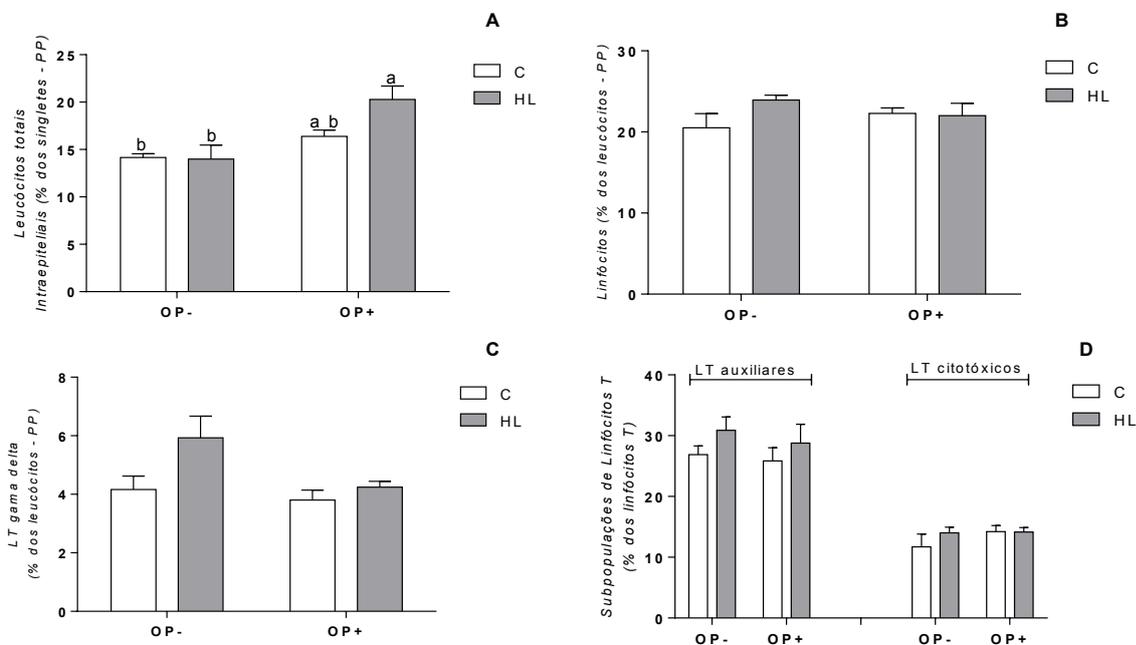


C = Dieta controle; HL: Dieta hiperlipídica. OP- = grupos tratados com dietas C e HL sem óleo de pequi. OP+ = grupos tratados com dietas C e HL e 150 mg/dia de óleo de pequi (CP e HLP). Valores expressos em média \pm erro padrão. N = 7 animais por grupo experimental. Barras acompanhadas de letras diferentes, diferem entre si por Two-way ANOVA e teste Tukey; $p < 0,05$.

Nas placas de *peyer*, observamos um maior percentual de leucócitos totais no grupo HLP com relação aos grupos HL ($p<0,05$) e C ($p<0,05$) (Fig. 12A).

Os linfócitos totais (Fig. 12B) e suas subpopulações (Fig. 12D) assim como os linfócitos $T\gamma\delta$ (Fig. 12C) não foram alterados significativamente pelos tratamentos com óleo de pequi ou dieta hiperlipídica em todos os grupos experimentais. Contudo é importante observar que o grupo HL elevou os linfócitos $T\gamma\delta$ em aproximadamente 34% em comparação ao C o grupo HLP, o qual apresentou 31% a menos dessas células em comparação ao HL.

Figura 12 Percentual de leucócitos totais, de linfócitos T e suas subpopulações e linfócitos $T\gamma\delta$ presentes em placas de *peyer* do intestino delgado dos animais experimentais



C = Dieta controle; HL: Dieta hiperlipídica. OP- = grupos tratados com dietas C e HL sem óleo de pequi. OP+ = grupos tratados com dietas C e HL e 150 mg/dia de óleo de pequi (CP e HLP). Valores expressos em média \pm erro padrão. N = 7 animais por grupo experimental. Barras acompanhadas de letras diferentes, diferem entre si por Two-way ANOVA e teste Tukey; $p<0,05$.

7 DISCUSSÃO

Este estudo teve como questão primária investigar efeitos da ingestão do óleo de pequi em elementos da resposta imune do epitélio intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Para tal, foi realizado um ensaio biológico, no qual camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica e ingeriram diariamente 150 mg de óleo de pequi homogeneizados em dieta, de modo a corresponder a aproximadamente 8% da ingestão calórica diária.

Inicialmente, podemos inferir que os grupos HL e HLP tornaram-se obesos, já que suas massas corporais finais foram significativamente superiores ao grupo C. Apesar de, quantitativamente, terem ingerido menos quantidade que os C, como a densidade energética dessas dietas é maior, acabaram por ingerir mais calorias, o que certamente foi um dos determinantes da obesidade (PATTERSON et al., 2014).

Neste contexto, o óleo de pequi parece ter atenuado o grau da obesidade, já que o ganho de massa corporal foi menor para o grupo HLP em relação ao grupo HL. O menor ganho de massa do grupo HLP ocorreu independente da ingestão alimentar, sendo que, os animais de ambos os grupos hiperlipídicos receberam dieta com a mesma densidade calórica, e o grupo HLP apresentou ainda maior ingestão alimentar, e um menor ganho de massa corporal, possivelmente, devido a modulação da qualidade dos lipídeos da dieta, com um maior aporte de ácidos graxos monoinsaturados presente no óleo de pequi. Já foi demonstrado anteriormente que os ácidos graxos saturados, devido à ausência de ligações duplas, têm um rendimento energético mais alto por átomo de carbono do que os ácidos graxos insaturados, portanto, são preferencialmente incorporados aos estoques de tecido adiposo (SHI et al., 2006; SOLINAS et al., 2006).

Outro fator determinante foi a ingestão lipídica (g e Kcal), a qual foi maior para esses grupos (HL e HLP). Tem sido indicado que a incorporação de lipídeos da dieta em triacilgliceróis no tecido adiposo, especialmente no visceral, gasta menos energia quando comparada a carboidratos ou proteínas, favorecendo o ganho de massa corporal, especialmente de gordura (HU *et al.*, 2018). Além disso, a perda fecal de energia advinda da gordura dietética é menor quando a razão gordura/carboidrato dietética é alta (ASTRUP, 2001), como foi o caso das dietas HL e HLP. Woods *et al.* (2003) postulam que a maior ingestão de gordura em longo prazo é capaz de romper a homeostase energética, favorecendo o aumento da massa corporal, independente de excesso de calorias.

Por outro lado, a adiposidade visceral não foi alterada quando o OP foi ingerido na dieta controle (CP) em relação ao grupo C e foi reduzida quando ele foi ingerido na dieta hiperlipídica (HLP) comparado ao grupo HL, se igualando aos grupos C e CP. Os animais do grupo HLP apresentaram ainda uma menor massa das gorduras retroperitoneal, epididimal e mesentérica em relação ao grupo HL. Esses achados estão em consonância com a eficiência energética, já que a ingestão do OP na dieta hiperlipídica tornou os animais menos eficientes em transformar calorias em gordura corporal. Este é um resultado importante, já que o acúmulo de gordura na região visceral está fortemente associado ao desenvolvimento das inúmeras comorbidades da obesidade (DINH *et al.*, 2015).

Alguns trabalhos anteriores do nosso grupo vêm mostrando efeito similar do óleo ou polpa de pequi, tanto em animais saudáveis, quanto em animais alimentados com dieta obesogênica, substituindo parte do seu conteúdo lipídico (MENDES, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2017; CÉSAR *et al.*, 2017; MORENO *et al.*, 2016; CÉSAR, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Dentre as hipóteses para este efeito diferencial, chamamos atenção para a contribuição do aumento do aporte de MUFA para os animais HLP. Os MUFA, em especial o ácido oleico, predominam no óleo de pequi. Esses ácidos graxos vêm sendo associados à maior atividade termogênica, já que apresentam maior taxa de oxidação quando comparados a outros ácidos graxos. SIHAG e JONES (2018), por exemplo, apontaram que o aumento da proporção de MUFA em lugar de SFA na dieta de humanos aumentou a taxa de oxidação de lipídeos. Ainda, Kien, Bunn e Ugrasbul (2005) demonstraram também maiores taxas de oxidação de lipídeos em humanos alimentados com dieta rica em MUFA, quando comparados com outros alimentados com dieta rica em SFA.

Outro potencial efeito pode ter sido advindo da ingestão de carotenoides pelos animais HLP. O óleo de pequi apresenta abundância nesses compostos. Diversos estudos demonstraram ação antiadiposidade e anti-inflamatória de carotenoides e derivados de carotenoides na obesidade (BONET *et al.*, 2015; HOSOKAWA *et al.*, 2010; RIBOT *et al.*, 2001). Alguns autores postularam que vários carotenoides têm capacidade de aumentar a excreção fecal de gordura, inibir a atividade da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG), uma enzima limitante da biossíntese do colesterol, e ativar a lipase lipoproteica (LLP), uma enzima relacionada à hidrólise de triglicérides de lipoproteínas (AGUILAR *et al.*, 2011; AGUILAR *et al.*, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2016). Além disso, carotenoides podem atuar na defesa contra danos oxidativos, o que contribui para melhorar o metabolismo dos adipócitos (CERQUEIRA *et al.*, 2007). Todos esses efeitos podem ter contribuído para a menor adiposidade visceral dos animais HLP.

Apesar da menor adiposidade visceral, a ingestão do OP na dieta hiperlipídica não melhorou a tolerância à glicose. Nós inferimos que o excesso de gordura e de SFA da dieta hiperlipídica possa estar relacionado. Sabe-se que distúrbios do metabolismo da glicose ocorrem rapidamente quando roedores são alimentados com dieta hiperlipídica. Cani *et al.* (2008) observaram menor tolerância à glicose em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (60 Kcal%), após quatro semanas de tratamento. Nós também observamos esse mesmo resultado quando alimentamos camundongos com dieta de padrão ocidental (43 Kcal%), após doze semanas de tratamento (CÉSAR, 2015).

Está bem estabelecido que a sobrecarga de gordura dietética, em especial de SFA, leva ao aumento de ácidos graxos livres circulantes. Esses AG são capazes de se ligar a receptores do tipo *toll-like* (TLR-4) na membrana celular, promovendo a ativação das quinases IκK e JNK (*c-jun N-terminal kinase*) que são proteínas intracelulares envolvidas em processos de sinalização (GAO *et al.*, 2004). Após serem ativadas, a IκK e a JNK fosforilam o IRS-1 em resíduos de serina, reduzindo a atividade de tirosina quinase (IRS-1 e IRS-2) e a atividade da PI3q (PROTEÍNAS RELACIONADAS AO RECEPTOR DE INSULINA), o que compromete a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, culminando com menor captação de glicose pela célula. (UENO *et al.*, 2005; MAYER; BELSHAM, 2010)

Adicionalmente, estudos em humanos e animais demonstram que uma elevação na concentração plasmática de ácidos graxos advinda da maior ingestão lipídica ou infusão intralipídica, resultam na elevação da produção endógena de glicose (SALORANTA *et al.*, 1993). A produção endógena de glicose é o resultado glicogenólise e da gliconeogênese (HUNDAL *et al.*, 2000). A taxa de gliconeogênese é regulada e governada pela atividade de diversas enzimas, tais como a fosfoenol piruvato carboxiquinase, a frutose-1,6 bifosfatase e a glicose-1,6 fosfatase (PILKIS; GRANNER, 1992). Song *et al.* (2001) demonstraram em ratos que o excesso de gordura dietética estimulou a gliconeogênese hepática a partir da alanina porque aumentou as concentrações da enzima frutose-1-6-bifosfatase. Jin *et al.*, (2013) demonstraram que a elevação da gliconeogênese a partir de glicerol em ratos alimentados com dieta hiperlipídica foi uma alteração metabólica precoce, já ocorrendo após 3 dias de alimentação.

Assim, é provável que a ingestão do óleo de pequi na dieta HLP tenha, de fato, exercido algum efeito protetor na deposição lipídica visceral, mas é também provável que a sobrecarga lipídica associada a um maior aporte de SFA tenham sido os maiores determinantes dos desfechos observados na tolerância à glicose.

Partindo do pressuposto de que o distúrbio imunometabólico da obesidade envolve também a ativação do sistema imune da mucosa intestinal, nós partimos para a investigação de alterações em células envolvidas diretamente com a resposta imune e que podem ser ativadas direta ou indiretamente através do seu contato com componentes da dieta que chegam na mucosa do intestino delgado. Assim, nós investigamos alterações de fenótipo das células imunes no compartimento intraepitelial e nas placas de *peyer* da mucosa do intestino delgado e nos linfonodos mesentérico.

O aumento de leucócitos no intestino delgado do grupo HLP em relação ao grupo HL não pode ser explicado pelo aumento de linfócitos T e suas subpopulações, uma vez que não houve aumento significativo dessas células nos referidos grupos. Assim, embora não tenhamos mensurado as células da imunidade inata no presente estudo, deve ser observada uma possível influência dessas células, no aumento de leucócitos totais no intestino dos animais do grupo HLP em relação ao grupo HL. As células da imunidade inata possuem o marcador de superfície celular CD45, a qual é reconhecida como marcador de leucócitos. Tem sido demonstrado aumento de macrófagos, células dendríticas (DC) maduras e células NK no intestino de humanos obesos (MONTEIRO-SEPULVEDA *et al.*, 2015), e aumento relativo de macrófagos e DCs no intestino de roedores alimentados com dieta hiperlipídica (JOHNSON *et al.*, 2015), o que pode ter contribuído para o aumento do percentual de leucócitos no intestino.

Pouco se sabe sobre a influência de dieta hiperlipídica nos subconjuntos de macrófagos intestinais e células dendríticas, porém está bem estabelecido na literatura a influência de ácidos graxos insaturados de cadeia longa na ativação dessas células. Derivados de ácidos graxos insaturados de cadeia longa que são gerados pela via da lipoxigenase, ativam os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs), que são importantes reguladores da diferenciação, desenvolvimento e metabolismo celular (FORMAN *et al.*, 1995; KLIEWER *et al.*, 1995) amplamente expressos por macrófagos e células dendríticas (CLARK *et al.*, 2000).

Curiosamente, no que diz respeito aos macrófagos, a detecção do PPAR- γ pelos derivados de ácidos graxos insaturados, ativa somente os macrófagos do tipo M2 e protege contra a ativação do macrófago do tipo M1 e a resistência à insulina (ODEGAARD *et al.*, 2007). Os macrófagos M2 desempenham papel no reparo tecidual, na angiogênese e na melhora da inflamação (LUMENG *et al.*, 2007). Assim, inferimos que o ácido graxo oleico presente no óleo de pequi possa ter contribuído para a ativação e aumento da expressão de macrófagos do tipo M2, o que pode ter contribuído para um reparo tecidual da parede intestinal dos animais do grupo HLP.

Adicionalmente, a interação entre as subpopulações de linfócitos e seus produtos liberados pode explicar, em parte, a elevação no percentual de leucócitos totais observada no intestino. O aumento da ordem de 15 % nas células T CD4+ nos linfonodos mesentéricos do grupo HLP em relação ao grupo HL, pode ter influenciado, pelo menos em parte, no aumento do percentual de leucócitos do grupo HLP no intestino delgado. A relação dos percentuais de células nos linfonodos e no intestino delgado pode ocorrer porquê, anatomicamente, existe circulação linfática direta entre os linfonodos mesentéricos e o intestino delgado, sendo que o jejuno é drenado para os LNM médios e o íleo distal é drenado para os segmentos distais dos LNM (MOWAT *et al.*, 2014). Curiosamente, as células T CD4+ possuem ampla habilidade de tráfego de órgãos linfoides para tecidos distantes (MORTON *et al.*, 2014).

O TNF- α secretado pelas células T CD4+ é um importante mediador da resposta imune celular, dentre suas funções, ele favorece o recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação, por estimular o endotélio a expressar moléculas de adesão e também por estimular macrófagos e células endoteliais a secretarem quimiocinas, importantes no recrutamento tecidual de leucócitos (APOSTOLAKI *et al.*, 2010; WAJANT, 2009). Assim as células diferenciadas nos linfonodos podem transitar diretamente para o intestino, o que, em nosso estudo, pode explicar, em parte, o aumento da população de leucócitos por recrutamento e infiltração do epitélio.

Concomitantemente, houve aumento no percentual de leucócitos nas placas de peyer do grupo hiperlipídico que recebeu o óleo de pequi (HLP) em relação ao grupo alimentado apenas com a dieta hiperlipídica (HL). As placas de peyer são um importante local de ativação celular de linfócitos B em plasmócitos que foram apresentados à antígenos pelas células dentríticas e macrófagos (KOBAYASHI *et al.*, 2019). Embora não tenhamos mensurado os linfócitos B, o aumento da ativação dessas células pode ter contribuído para a elevação do percentual de leucócitos totais nas placas de peyer.

Com relação aos linfócitos totais e suas subpopulações nos linfonodos mesentéricos, verificamos que a diminuição no percentual de células T CD4+ no grupo CP em relação ao grupo C ($p < 0,05$) pode explicar os menores percentuais (53,43%), embora não significativos, de células T CD8+. As células T CD4+ estão envolvidas na coativação das células T CD8+ (JANSSEN *et al.*, 2005; LAIDLAW, CRAFT e KAECH *et al.*, 2016). Assim, uma menor porcentagem de células T CD4+ em atividade pode influenciar em um menor número de células T CD8+. Devido ao canal linfático direto que permite a transição celular entre os linfonodos mesentéricos e o intestino delgado (MOWAT *et al.*, 2014), este resultado pode ser explicado ainda pelo menor percentual de linfócitos totais no grupo CP com relação

ao grupo C ($p < 0,05$) no intestino delgado, o que pode ter influenciado na redução das suas subpopulações. Assim, uma menor população de linfócitos totais refletiu na redução da expressão de suas subpopulações.

Com base nestes resultados, a administração do óleo de pequi parece ter potencial para suprimir a celularidade nos linfonodos. De Pablo *et al.* (1998) observaram redução na proliferação de linfócitos isolados de baço e estimulados por lipopolissacarídeos, em camundongos Balb/c alimentados com óleo de oliva em comparação aos óleos de girassol ou óleo de coco hidrogenado. Os resultados foram atribuídos ao conteúdo de ácido oleico e compostos antioxidantes do óleo.

Em princípio, nós inferimos que o aumento do aporte de MUFA (ácido oleico) pode ter sido responsável, pelo menos em parte, por este efeito. Os ácidos graxos predominantes no óleo de pequi são MUFA ($58,49 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), especialmente ácido oleico ($57,42\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Portanto, o maior aporte de ácido oleico resultante da administração do óleo de pequi pode ter corroborado para esse resultado.

Em relação aos carotenoides, dentre as características químicas pelas quais esses compostos podem contribuir com a resposta imune, está a sua natureza hidrofóbica, que facilita a incorporação em diversas membranas, e a atividade antioxidante. Quando incorporados na membrana eles podem diminuir a peroxidação lipídica, o que contribui para a melhoria da funcionalidade dessas células. Além disso, alguns carotenoides, como o β -caroteno, são precursores da vitamina A. A vitamina A (ácido retinoico, especificamente) tem função na diferenciação bem como na integridade celular, o que impacta significativamente na manutenção da estrutura da mucosa (MUCIDA *et al.*, 2007).

Além disso, o ácido retinóico possui papel na indução da tolerância por redução da produção de IFN γ em células T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ (VAN *et al.*, 2009). Assim, em condição de homeostasia, há uma atenuação do percentual e consequente resposta das células imunes contra patógenos estrangeiros, antígenos alimentares e bactérias comensais. Em nosso estudo, os animais do grupo CP não foram expostos a nenhum mitógeno ou desafio imunológico. Assim, os resultados encontrados indicam uma interação espontânea dos componentes bioativos do óleo de pequi com as referidas populações linfocitárias.

No presente estudo não verificamos alterações nas subpopulações de linfócitos (CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$) no intestino delgado, nas placas de peyer e nos linfonodos dos grupos HL e HLP, embora algumas dessas células tenham apresentado mudanças interessantes em porcentagem, porém não significativas. É importante notar que nem todos os estudos concordam com o tempo exato e a sequência que os eventos fenotípicos ocorrem (LUKE *et al.*,

2015; MONTES *et al.*, 2013). Luck *et al.*, (2015) não observaram alterações significativas na proporção de subpopulações de linfócitos T com três semanas de protocolo experimental. No mesmo estudo, os autores encontraram aumento dos linfócitos T CD4+ e linfócito T CD8 no intestino delgado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica somente após 12 semanas de experimento. Montes *et al.*, (2013) na administração de dieta com alto teor de gordura e alto teor de sacarose a camundongos C57BL/6 encontraram aumento de células T CD8+ somente após 16 semanas de experimento.

Em princípio, nos inferimos que um fator limitante para o resultado encontrado no presente estudo pode ter sido o tempo do protocolo experimental, que foi realizado durante 10 semanas. Consistentemente, Winer *et al.*, (2016) afirmam que a discrepância de resultados entre estudos se deva a diferença de fatores ambientais como exemplo da dieta e a microbiota. Ivanov *et al.*, (2009) ponderaram que as variações na mudança no número de subpopulações de T CD4+ entre os estudos provavelmente ocorrem devido às diferenças na duração da exposição à dieta hiperlipídica. Assim, o tempo de administração da dieta hiperlipídica nos grupos experimentais, pode explicar, pelo menos em parte, a falta de alteração no número das referidas células T nos compartimentos analisados.

Com relação aos linfócitos T $\gamma\delta$, no presente estudo, demonstramos aumento na porcentagem de linfócitos T $\gamma\delta$ nos grupos hiperlipídicos (HL e HLP) em relação aos controles (C e CP) ($p < 0,05$) no intestino delgado, mas não houve diferença nos linfonodos e nas placas de peyer. Nas placas de peyer também houve aumento dos linfócitos T $\gamma\delta$, embora não significativo, no grupo HL em relação ao grupo C (34%) e HLP (31%).

Alguns estudos da literatura corroboram com o presente resultado, afirmando a capacidade do excesso de gordura na elevação dos linfócitos T $\gamma\delta$. Na investigação de alterações celulares em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica durante 3, 12 e 16 semanas, Luck *et al.* (2015) observaram aumento de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17, mas não produtoras de interferon em amostras do intestino delgado (Jejuno e íleo).

Estudos demonstram efeitos de compostos bioativos de alimentos na elevação das células T $\gamma\delta$ (PERCIVAL, BUKOWSKI e MILNER, 2008), como MUFAs e carotenoides (dados não publicados). Porém, no presente estudo, os nossos achados demonstram uma influência da dieta hiperlipídica na elevação percentual dessas células, sendo que o óleo de pequi não influenciou nos resultados.

8 CONCLUSÃO

A ingestão do óleo de pequi em uma dieta hiperlipídica promoveu um aumento de células imunes na mucosa intestinal dos camundongos. Nós acreditamos que, possivelmente, este aumento tenha sido de células da imunidade inata, como os macrófagos, com consequente melhora no reparo do epitélio intestinal, o que em última instância, pode ter contribuído para a perda de peso corporal observada nesses animais.

9 REFERÊNCIAS

ABREU, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 131-144, 2010.

AGUILAR, E. C. et al. Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 7, p. 601-609, 2012.

AGUILAR, E. C. et al. Serum lipid profile and hepatic evaluation in mice fed diet containing pequi nut or pulp (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Food Science and Technology**, v. 31, n. 4, p. 879-883, 2011.

AHMAD, A. et al. Aging and inflammation: etiological culprits of cancer. **Current aging science**, v. 2, n. 3, p. 174-186, 2009.

AL-SADI, R. M.; MA, T Y. IL-1 β causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4641-4649, 2007.

AMAR, J. et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO molecular medicine**, v. 3, n. 9, p. 559-572, 2011.

APOSTOLAKI, M. et al. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. In: **TNF Pathophysiology**. Karger Publishers, 2010. p. 1-26.

ARMANI, A. et al. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. **Journal of cellular biochemistry**, v. 110, n. 3, p. 564-572, 2010.

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. The phytochemistry and biological aspects of Caryocaraceae family. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 293-308, 2013.

ASCARI, J; TAKAHASHI, J. A; BOAVENTURA, M. A. D. Phytochemical and biological investigations of *Caryocar brasiliense* Camb. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y Aromaticas**, v. 9, n. 1, p. 20-28, 2010.

ASTRUP, A. The role of dietary fat in the prevention and treatment of obesity. Efficacy and safety of low-fat diets. **International Journal of Obesity**, v. 25, p. 46–S50, 2001.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3, p. 385-396, 2004.

BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BACKUS, R; WARAS, A. Development of obesity: Mechanisms and physiology. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 46, n.5, p 773-784, 2016.

BAHIA, L. et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 12, p. 440, 2012.

BAKDASH, G. et al. Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. **Mucosal immunology**, v. 8, n. 2, p. 265-278, 2015.

BANDEIRA, A. et al. Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 1, p. 239-244, 1990

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. **The Journal of Nutrition**, v. 119, n. 1, p. 112-115, 1989.

BIAN, Q. et al. Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 6, p. 1298-1307, 2012.

BLÜHER, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 27, n.2, p. 163-177, 2013.

BONET, M. L. et al. A. Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. **Arch Biochem Biophys.**, v. 15, n. 572, p. 112-125, 2015.

BOUSTANY, C. M. et al. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 4, p. 943-949, 2004.

BOZZETTO, L. et al. Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients. **Diabetes care**, v. 35, n. 7, p. 1429-1435, 2012.

BRASIL. Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018 Brasília: **Ministério da Saúde** 2019

CÂNDIDO, F. G. et al. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 69, n. 2, p. 125-143, 2018

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-1481, 2008.

- CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007.
- CAPUTO, T; GILARDI, F; DESVERGNE, B. From chronic overnutrition to metaflammation and insulin resistance: Adipose tissue and liver contributions. **FEBS letters**, v. 591, n. 19, p. 3061-3088, 2017.
- CARDOSO, C. R. et al. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 409-415, 2011
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.
- CÉSAR, N R. et al. The Partial Replacement of Lard by Caryocar brasiliense Oil in a Western Diet improves Cardiovascular Risk Factors in Rats. **F Nutr Reprt**, v. 1, n. 4, p. 1-8, 2017.
- CÉSAR, N. R. Efeitos da substituição parcial da banha de porco por óleo de pequi (caryocar brasiliense) em uma dieta ocidental sobre o metabolismo, a função cardíaca e o estado redox celular de ratos. 2015.85 p. **Dissertação** (Mestrado) - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.
- CHEN, B; MCCLEMENTS, D. J; DECKER, E. A. Design of foods with bioactive lipids for improved health. **Annual review of Food science and Technology**, v. 4, p. 35-56, 2013.
- CHEROUTRE, H; LAMBOLEZ, F; MUCIDA, DI. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 7, p. 445-456, 2011.
- CHEW, B. P.; PARK, J. S. Carotenoid action on the immune response. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 257S-261S, 2004
- CLARK, R. B. et al. The nuclear receptor PPAR γ and immunoregulation: PPAR γ mediates inhibition of helper T cell responses. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1364-1371, 2000.
- COLLEVATTI, Rosane G.; GRATTAPAGLIA, Dario; HAY, J. O. H. N. Evidences for multiple maternal lineages of Caryocar brasiliense populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 1, p. 105-115, 2003
- COLOMBO, N. B. R. et al. Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 852-862, 2015.
- COSTA, J. GM et al. Antibacterial properties of pequi pulp oil (Caryocar coriaceum–Wittm.). **International journal of food properties**, v. 14, n. 2, p. 411-416, 2011.
- COSTA-JÚNIOR, J. M.; et al. Endurance Training Inhibits Insulin Clearance and IDE Expression in Swiss Mice, **Plos one**, 2015.

COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v.3, n.3, p. 207-215, 2015.

CUI, G. et al. Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 2, p. 658-670, 2011.

DAVINELLI, S. et al. Astaxanthin from shrimp cephalothorax stimulates the immune response by enhancing IFN- γ , IL-10, and IL-2 secretion in splenocytes of Helicobacter pylori-infected mice. **Marine drugs**, v. 17, n. 7, p. 382, 2019.

DA SILVA QUIRINO, G. et al. Healing potential of Pequi (Caryocar coriaceum Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 179-183, 2009.

DE FIGUEIREDO, P. R. L. et al. Caryocar coriaceum Wittm.(Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 191, p. 87-94, 2016.

DEITCH, E. A.; XU, D. Z.; QI, L. Different lymphocyte compartments respond differently to mitogenic stimulation after thermal injury. **Annals of surgery**, v. 211, n. 1, p. 72, 1990

DESMARCHELIER, Cristian et al. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? *Phytotherapy Research*, v. 24, n. 6, p. 791, 2010.

DE MEDEIROS, P. H. QS et al. Modulation of intestinal immune and barrier functions by vitamin a: implications for current understanding of malnutrition and enteric infections in children. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1128, 2018.

DENNING, T. L. *et al.* Mouse TCR CD8 intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 4230-4239, 2007

DE OLIVEIRA, M. E. B. et al. Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi. **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

DE OLIVEIRA, M. L. M. et al. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of Caryocar coriaceum Wittm. seeds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 214-219, 2010

DE PABLO, M. A. **et al.** Influence of diets containing olive oil, sunflower oil or hydrogenated coconut oil on the immune response of mice. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 25, n. 1, p. 11-23, 1998

DING, S et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. **PloS one**, v. 5, n. 8, 2010.

DINH, C. H. L. et al. Bardoxolone methyl prevents fat deposition and inflammation in the visceral fat of mice fed a high-fat diet. **Chemico-Biological Interactions**, v. 229, n. 5, p. 1-8, 2015.

DISPIRITO, J. R.; MATHIS, D. Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 315-321, 2015.

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

FAN, Hui et al. Innate Lymphoid Cells: Regulators of Gut Barrier Function and Immune Homeostasis. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

FARIA, A. M. C.; REIS, B. S.; MUCIDA, D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, p. jem. 20162014, 2017.

FARIA-MACHADO, A. F. et al. Discrimination of pulp oil and kernel oil from pequi (*Caryocar brasiliense*) by fatty acid methyl esters fingerprinting, using GC-FID and multivariate analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 45, p. 10064-10069, 2015.

FELIPPE, F.; SANTOS, A. M. Novas demandas profissionais: obesidade em foco. **Rev ADPPUCRS**, v. 5, p. 63-70, 2004

FIELD, B. C. T. **Neuroendocrinology of obesity**. British Medical Bulletin, v. 109, n. 1, p. 73-82, 2014.

FIGUEIREDO, P. R. L. et al. Caryocar coriaceum Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 87-94, 2016.

FINUCANE, O. M. et al. Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 6, p. 2116-2128, 2015.

FRENCH, S. J. et al. The effects of intestinal infusion of long-chain fatty acids on food intake in humans. **Gastroenterology**, v. 119, p. 943-948, 2000

FORMAN, B. M. et al. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 541-550, 1995.

FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446-450, 2013.

FU, X. et al. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7) A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 41279-41287, 2001.

GAO, Z. et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular endocrinology**, v. 18, n. 8, p. 2024-2034, 2004.

GARIDOU, L. et al. A microbiota intestinal regula as células T CD4 intestinais que expressam ROR γ t e controla as doenças metabólicas. **Metabolismo celular**, v. 22, n. 1, p. 100-112, 2015.

GILLINGHAM, L. G.; HARRIS-JANZ, S.; JONES, P. J. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. **Lipids**, v. 46, n. 3, p. 209-228, 2011

GUARNER, F.. Enteric flora in health and disease. **Digestion**, v. 73, n. Suppl. 1, p. 5-12, 2006.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives Toxicological**, v. 86, p. 345–391, 2012.

GUPTA, N. et al. Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. **Endocrine reviews**, v. 33, n. 1, p. 48-70, 2012

GUY-GRAND, D. et al. Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN- γ , TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. **European journal of immunology**, v. 28, n. 2, p. 730-744, 1998.

HASE, K. et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 226-230, 2009.

HOSOKAWA, M. et al. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-Ay mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 504, p. 17-25, 2010.

HU, S. et al. **Dietary Fat, but Not Protein or Carbohydrate, Regulates Energy Intake and Causes**. Adiposity in Mice, 2018.

HUNDAL, R. S. et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 49, p. 2063–2069, 2000.

IMAMURA, F. et al. Effects of saturated fat, polyunsaturated fat, monounsaturated fat, and carbohydrate on glucose-insulin homeostasis: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled feeding trials. **PLoS medicine**, v. 13, n. 7, 2016.

IVANOV, I. I. et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485-498, 2009.

IWATA, M. *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 527-538, 2004.

- JANZ, K. F. et al. Physical Activity, Not Sedentary Time, Predicts Dual-Energy X-ray Absorptiometry-measured Adiposity Age 5 to 19 Years. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 49, n. 10, p. 2071-2077, 2017
- JIN, E. S. et al. Hepatic glucose production pathways after three days of a high-fat diet. **Metabolism**, v. 62, n. 1, p. 152-162, 2013.
- JOHNSON, A. M. F. et al. High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. **PloS one**, v. 10, n. 4, 2015.
- JORGE, A. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of Caryocar brasiliense. **Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry**, 2019.
- JUNG, J. H. et al. Obesity as a Risk Factor for Prostatic Enlargement: A Retrospective Cohort Study in Korea. **International neurourology journal**, v. 20, n. 4, p. 321, 2016.
- JURADO-RUIZ, Enrique et al. An extra virgin olive oil rich diet intervention ameliorates the nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat “Western-type” diet in mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 3, p. 1600549, 2017.
- KIEN, C. L. et al. Dietary intake of palmitate and oleate has broad impact on systemic and tissue lipid profiles in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 99, n. 3, p. 436-445, 2014.
- KIEN, C. L. et al. Lipidomic evidence that lowering the typical dietary palmitate to oleate ratio in humans decreases the leukocyte production of proinflammatory cytokines and muscle expression of redox-sensitive genes. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1599-1606, 2015.
- KIEN, C.L.; BUNN, J.Y.; UGRASBUL, F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. **Am J Clin Nut.**, v. 82, p. 320-326, 2005
- KIJLSTRA, A. et al. Lutein: more than just a filter for blue light. **Progress in retinal and eye research**, v. 31, n. 4, p. 303-315, 2012.
- KIM, Y.; SEO, J. H; KIM, H. β -Carotene and lutein inhibit hydrogen peroxide-induced activation of NF- κ B and IL-8 expression in gastric epithelial AGS cells. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 57, n. 3, p. 216-223, 2011.
- KIRWAN, A. M. *et al.* Nutritional modulation of metabolic inflammation. **Biochemical Society Transactions**, p. BST20160465, 2017.
- KISS, E. A. et al. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. **Science**, v. 334, n. 6062, p. 1561-1565, 2011.
- KLIEWER, S. A. et al. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. **Cell**, v. 83, n. 5, p. 813-819, 1995.

KLOSE, C. SN et al. The transcription factor T-bet is induced by IL-15 and thymic agonist selection and controls CD8 $\alpha\alpha$ + intraepithelial lymphocyte development. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 230-243, 2014.

KOBAYASHI, Nabuhide et al. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*, v. 10, p. 2345, 2019.

KOH, Ara et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332-1345, 2016.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KOMANO, H. et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 13, p. 6147-6151, 1995.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KRISHNAN, S. E COOPER, J.A. Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans. **Eur J Nutr**, v. 53 n. 3 p. 691-710, 2014.

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 541-546, 2013.

LEE, A.Y. et al. Dendritic cells in colonic patches and iliac lymph nodes are essential in mucosal IgA induction following intrarectal administration via CCR7 interaction. **European journal of immunology**, v. 38, n. 4, p. 1127-1137, 2008.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012.

LI, Y. et al. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. **Cell**, v. 147, n. 3, p. 629-640, 2011

LIM, J. Y. et al. Dietary β -Cryptoxanthin Inhibits High-Refined Carbohydrate Diet-Induced Fatty Liver via Differential Protective Mechanisms Depending on Carotenoid Cleavage Enzymes in Male Mice. **The Journal of nutrition**, v. 149, n. 9, p. 1553-1564, 2019.

LIMA, A.; et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LINNEWIEL-HERMONI, K. et al. Carotenoid derivatives inhibit nuclear factor kappa B activity in bone and cancer cells by targeting key thiol groups. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, p. 105-120, 2014.

LUCILLIA, R. de O. et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 205-216, 2016.

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

LUKOVAC, S. et al. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids. **MBio**, v. 5, n. 4, p. e01438-14, 2014.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

MAIANI, G. et al. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 194–218, 2009.

MAYER, C. M.; BELSHAM, D. D. Central insulin signaling is attenuated by long-term insulin exposure via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation, proteasomal degradation, and lysosomal insulin receptor degradation. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 75-84, 2010.

MCGEACHY, M. J. et al. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T H-17 cell-mediated pathology. **Nature immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390, 2007.

MCLAUGHLIN, T. et al. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 1, p. 5-13, 2017.

MELGAR, S. et al. Human small intestinal mucosa harbours a small population of cytolytically active CD8⁺ $\alpha\beta$ T lymphocytes. **Immunology**, v. 106, n. 4, p. 476-485, 2002.

MENDES, Mateus Ferreira. Efeitos do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no balanço energético e em biomarcadores imunometabólicos de camundongos alimentados com dietas balanceada e hiperlipídica. **Dissertação de mestrado**. Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia. 2019. 78p.

MENNELLA, I. et al. Oleic acid content of a meal promotes oleoylethanolamide response and reduces subsequent energy intake in humans. **Food Funct.** v. 6, n. 1, p. 204–210, 2015.

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

MILLEN, B. E. et al. 2013 American Heart Association/American College of Cardiology Guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: practice opportunities for registered dietitian nutritionists. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 114, n. 11, p. 1723-1729, 2014.

- MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1161-1176, 2014.
- MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 956-963, 2008.
- MONTEIRO-SEPULVEDA, M. et al. Jejunal T cell inflammation in human obesity correlates with decreased enterocyte insulin signaling. **Cell metabolism**, v. 22, n. 1, p. 113-124, 2015.
- MONTES, V. N. et al. T cell activation inhibitors reduce CD8+ T cell and pro-inflammatory macrophage accumulation in adipose tissue of obese mice. **PLoS One**, v. 8, n. 7, 2013.
- MORENO, L. G. et al. *Caryocar brasiliense* fruit intake ameliorates hepatic fat deposition and improves intestinal structure of rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 37, p. 640-648, 2016.
- MORITA, N. et al. GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1+ cells by bacterial metabolites. **Nature**, v. 566, n. 7742, p. 110-114, 2019.
- MORTON, A. M. et al. Endoscopic photoconversion reveals unexpectedly broad leukocyte trafficking to and from the gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 18, p. 6696-6701, 2014.
- MORTON, N. M. et al. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. **J Biol Chem**, v. 276, n. 44, p. 41293-300, Nov 2 2001
- MOTA-SANTOS, T. *et al.* Divergency in the specificity of the induction and maintenance of neonatal suppression. **European journal of immunology**, v. 20, n. 8, p. 1717-1721, 1990.
- MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667-685, 2014.
- MUCIDA, D. *et al.* Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256-260, 2007
- MUCIDA, D. et al. Transcriptional reprogramming of mature CD4+ helper T cells generates distinct MHC class II–restricted cytotoxic T lymphocytes. **Nature immunology**, v. 14, n. 3, p. 281, 2013.
- MURPHY, A. M. et al. Interactions between differential fatty acids and inflammatory stressors — impact on metabolic health. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 92, p. 49-55, 2015.
- NISHIMURA, S. et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 914, 2009.

ODEGAARD, J. I. et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116-1120, 2007.

OLIVEIRA, L. G. et al. Caryocar brasiliense oil improves cardiac function by increasing Serca2a/PLB ratio despite no significant changes in cardiovascular risk factors in rats. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 37, 2017

OLIVEIRA, M. N. S.; et al, B. A. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Rev Bras Frutic**, v. 28p. 380-6, 2006.

OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D; VAN KAER, L. Intestinal intraepithelial lymphocytes: sentinels of the mucosal barrier. **Trends in immunology**, v. 39, n. 4, p. 264-275, 2018.

PALMEIRA, S. M. et al. Chemopreventive effects of pequi oil (CaryocarbrasilienseCamb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 4, p. 299-305, 2016.

PATTERSON, E. et al. Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 11, p. 1905-1917, 2014

PERCIVAL, S. S.; BUKOWSKI, J. F.; MILNER, J. Bioactive food components that enhance $\gamma\delta$ T cell function may play a role in cancer prevention. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 1, p. 1-4, 2008.

PEREIRA, P. et al. Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. **European journal of immunology**, v. 16, n. 6, p. 685-688, 1986.

PETERSON, L.W.; ARTIS, D.. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141-153, 2014.

PILKIS, S. J. e GRANNER, D. K.. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 885–909, 1992.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K.. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

QIAN, F. et al. Metabolic effects of monounsaturated fatty acid–enriched diets compared with carbohydrate or polyunsaturated fatty acid–enriched diets in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Diabetes care**, v. 39, n. 8, p. 1448-1457, 2016.

REBOLDI, A.; CYSTER, J. G. Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. **Immunological reviews**, v. 271, n. 1, p. 230-245, 2016.

REEVES, P. G. et al. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

REIS, B. S. et al. Transcription factor T-bet regulates intraepithelial lymphocyte functional maturation. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 244-256, 2014.

RIBOT, J. et al. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR γ 2 expression. **Obesity Research**, [online], v. 9, n. 8, p. 500-509, 2001.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of Caryocar brasiliense (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 711-717, 2008.

ROLL, M. M. et al. The pequi pulp oil (Caryocar brasiliense Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. **Genetics and molecular biology**, v. 41, n. 4, p. 858-869, 2018.

ROMACHO, T., et al. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. **Acta physiologica**, 2014, v. 210, n. 4, p. 733-753, 2014.

ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 6, p. 341-352, 2016.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature reviews immunology**, v. 9, n. 5, p. 313-323, 2009.

ROUND, J. L. et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. **Science**, v. 332, n. 6032, p. 974-977, 2011.

SALLUSTO, F., GEGINAT, J., & LANZAVECCHIA, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 745-763.

SALORANTA, C. et al.. Contribution of muscle and liver to glucose-fatty acid cycle in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 264, p. 599–E605, 1993.

SCHWINGSHACKL, L.; HOFFMANN, G. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and metaanalyses. **Nutrients**, v. 4, n. 12, p. 1989-2007, 2012

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015-3025, 2006.

SIHAG, J.; JONES, P. J. H. Oleoylethanolamide: the role of a bioactive lipid amide in modulating eating behaviour. **Obesity Reviews**, v.19, p.178-197, 2018.

SHIRES, J.; THEODORIDIS, E.; HAYDAY, A. C. Biological insights into TCR $\gamma\delta$ ⁺ and TCR $\alpha\beta$ ⁺ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). **Immunity**, v. 15, n. 3, p. 419-434, 2001.

- SIMONE, R. E. et al. Lycopene inhibits NF- κ B-mediated IL-8 expression and changes redox and PPAR γ signalling in cigarette smoke-stimulated macrophages. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19652, 2011.
- SOLINAS, G. et al. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 44, p. 16454-16459, 2006.
- SONG S. et al. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. **Am J Physiol Endocrinol Meta**, v. 281, p. 275–282, 2001.
- STAHL, W.; SIES. H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**,
- STORNILOLO, C. E. et al. Bioactive Compounds of Cooked Tomato Sauce Modulate Oxidative Stress and Arachidonic Acid Cascade Induced by Oxidized LDL in Macrophage Cultures. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1880, 2019.
- SUGANAMI, T.i; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n.1, p. 33-39, 2010.
- SUGIMOTO, K. et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 2, p. 534-544, 2008.
- SUJINO, T. et al. Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4⁺ T cells controls gut inflammation. **Science**, v. 352, n. 6293, p. 1581-1586, 2016.
- SURAI, P. F.; SPEAKE, B. K.; SPARKS, N. H. C. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. **The Journal of Poultry Science**, v. 38, n. 1, p. 1-27, 2001.
- TAKAYANAGI et al. Norepinephrine suppresses IFN- γ and TNF- α production by murine intestinal intraepithelial lymphocytes via the β 1 adrenoceptor. **Journal of Neuroimmunology**, v. 245, p. 66-74, 2012.
- TEIXEIRA, T. N, et al. Caryocar brasiliense pulp increases serum HDL and reduces hepatic lipid accumulation in rats fed a high fat diet. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, n. 15, p. 963-969, 2013
- THORBURN, A. N.; MACIA, La.; MACKAY, C. R. Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases. **Immunity**, v. 40, n. 6, p. 833-842, 2014.
- TIAN, H. et al. Apricot Kernel Oil Ameliorates Cyclophosphamide-Associated Immunosuppression in Rats. **Lipids**, v. 51, n. 8, p. 931-939, 2016.
- TORRES, L. R. O. et al. Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. **Embrapa Cerrados-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.

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

UENO, M. et al. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. **Diabetologia**, v. 48, n. 3, p. 506-518, 2005.

VALE, A. F. et al. Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 257-262, 2019.

VAN DIJK, S. J. et al. Consumption of a High Monounsaturated Fat Diet Reduces Oxidative Phosphorylation Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Abdominally Overweight Men and Women—4. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 7, p. 1219-1225, 2012.

VAN, Y. H. et al. All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon- γ -producing T-cells without affecting Th17 cells. **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 146-155, 2009

VAN HELDEN, Y. G. J. et al. Organ specificity of beta-carotene induced lung gene-expression changes in *Bcmo1*^{-/-} mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 2, p. 307-319, 2013

VELDHOEN, M.; BRUCKLACHER-WALDERT, V. Dietary influences on intestinal immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 10, p. 696-708, 2012.

VERA, R. et al. Caracterização física e química de frutos do pequi (Caryocar brasiliense Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 37, n. 2, p. 93-99, 2007.

VIEIRA-POTTER, Victoria J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. **Cellular microbiology**, v. 16, n.10, p. 1484-149, 2014.

WAJANT, H. The role of TNF in cancer. In: **Death Receptors and Cognate Ligands in Cancer**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 1-15.

WANG, J.; SAMPSON, H. A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 2009.

WINER, D. A. et al. Immunologic impact of the intestine in metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 1, p. 33-42, 2017.

WINER, D. A. et al. The intestinal immune system in obesity and insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 23, n. 3, p. 413-426, 2016.

WHO. Global strategy on diet, physical activity and health 2020. Disponível em: www.who.int/activities/preventing-noncommunicable-diseases/

WHO: *Obesity and Overweight*. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

WHO: *Obesity and Overweight*. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> >

WOODS, S. C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1081-1087, 2003.

WU, H. J. et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. **Immunity**, v. 32, n. 6, p. 815-827, 2010.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology*, v. 82, n. 4, p. 603, 1994

YAMAGUCHI, K. KL et al. HPLC-DAD profile of phenolic compounds, cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of the amazon fruit *Caryocar villosum*. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 483-490, 2017.

YU, S. et al. Failure of T cell homing, reduced CD4/CD8 $\alpha\alpha$ intraepithelial lymphocytes, and inflammation in the gut of vitamin D receptor KO mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 52, p. 20834-20839, 2008.

ZAIGER, G.; et al Vitamin A exerts its activity at the transcriptional level in the small intestine. **European Journal of Nutrition**, v. 43, p. 259–266, 2004.

