

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E DIP**

Beatriz Macedo de Oliveira Rocha

**Associações entre Obesidade e Microbiota Intestinal na Tuberculose
Experimental**

Juiz de Fora

2020

Beatriz Macedo de Oliveira Rocha

**Associações entre Obesidade e Microbiota Intestinal na Tuberculose
Experimental**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Elaine de Almeida

Juiz de Fora

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rocha, Beatriz Macedo de Oliveira.

Associações entre Obesidade e Microbiota Intestinal na Tuberculose Experimental / Beatriz Macedo de Oliveira Rocha. -- 2020.

81 f.

Orientadora: Patrícia Elaine de Almeida
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2020.

1. Obesidade. 2. Tuberculose. 3. Microbiota Intestinal. 4. Corpúsculos Lipídicos. I. Almeida, Patrícia Elaine de, orient. II. Título.

Beatriz Macedo de Oliveira Rocha

Associações entre Obesidade e Microbiota Intestinal na Tuberculose Experimental

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovada em 22 de abril de 2020

BANCA EXAMINADORA



Prof.(a) Dr.(a) Patricia Elaine de Almeida
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.(a) Dr.(a) Alessandra Barbosa Ferreira Machado
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.(a) Dr.(a) Patricia de Almeida Machado
Universidade Federal do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

Escrever os “agradecimentos” deveria ser uma das atividades mais simples da dissertação, porém encontro-me aqui – um tanto quanto perdida, confesso –, buscando palavras que perfeitamente se encaixem entre o parágrafo inicial e o proposto ponto final. Decidi começar a mesclar essas tantas consoantes e vogais para melhor expressar o quão significativa e imensurável é a gratidão que sinto por ser filha de “Martha Valéria Macedo de Oliveira Rocha” e “Pedro Manoel Arruda da Rocha”. Meus progenitores, meus pais, minha base, meus amores, minha essência. “*Beatriz*” nada seria sem essas duas almas inesquecíveis ao Universo. Eu poderia escrever outra dissertação apenas descrevendo tudo que meus pais representam na minha vida e como essa conquista não seria possível sem o apoio e o amor que recebi deles. Entretanto, vou me ater em apenas deixar aqui o meu “muito obrigada” a essas pessoas que tanto amo.

Minha família será sempre meu maior orgulho e minha prioridade, por isso dedico essa conquista, também, à minha irmã Carolina (que está sempre ao meu lado, vive e abraça as mesmas dores que eu), aos meus avós Gilda e João (que nunca nos deixaram desamparadas e sempre nos acolhem com muito amor), aos meus tios e tias, primos e primas (os quais sempre transmitem tanto carinho, votos de sucesso e se fazem sempre presentes apesar de nossa distância física).

Aos meus amigos de infância ou de menor data, irmãos que escolhi levar para a vida, parceiros nos momentos de alegria e de tristeza: meu “muito obrigada” a cada um de vocês. Meu coração inunda de felicidade por poder contar com tantas pessoas maravilhosas e essa conquista também dedico a vocês.

Finalmente, perdoem-me a retomada, mas gostaria de deixar um parágrafo dedicado exclusivamente e diretamente à minha mãe. Meu maior exemplo de garra, determinação, fé e amor pela vida. “Obrigada por todos os ensinamentos e por tanto amor. Você me carregou por 9 meses, me deu amor mesmo antes de me sentir em seus braços, cuidou de mim na minha fase mais vulnerável, me protegeu da minha ingenuidade, me ensinou a ver a vida com mais maturidade, acreditou em mim e nas minhas futuras conquistas. Você sempre esteve do meu lado, nunca me desamparou (nem mesmo quando era você quem precisava de um abraço), me teve como prioridade até o final da sua encarnação e eu só tenho a agradecer por cada segundo que estivemos juntas e por tudo que você fez e representa na minha vida. Essa

conquista é principalmente para você. Com muito amor, carinho e saudade. Amo
você”.

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde atual. Segundo a OMS, em 2016, 39% dos adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso e 13% foram diagnosticados com obesidade. No Brasil esse cenário é ainda mais preocupante, em que dados apontam um percentual de indivíduos adultos com sobrepeso de 54% e de indivíduos obesos de 18,9%, pelo Ministério da Saúde (2019). Além disso, a composição da microbiota de indivíduos magros e obesos é diferente e pode ter influência no desenvolvimento da obesidade, além de ter um papel significativo na modulação do sistema imune do hospedeiro. Assim, objetivamos avaliar as associações entre a obesidade e a microbiota intestinal na Tuberculose (TB) experimental. Para isso, camundongos da linhagem C57BL/6 machos foram submetidos a dieta hiperlipídica ou padrão e infectados ou não com *Mycobacterium bovis* BCG, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Nossos dados demonstraram que a dieta hiperlipídica foi capaz de induzir um quadro de obesidade após 12 semanas. Interessantemente, houve perda significativa de peso dos animais obesos após 96 h de infecção por *M. bovis* BCG. Houve aumento na formação de corpúsculos lipídicos frente a infecção em ambos os grupos estudados, porém a obesidade parece modular positivamente essa biogênese em 72 e 96 h. Entretanto, após 96 h de infecção, em ambos os grupos, houve uma diminuição significativa na formação dessas organelas. Nossos dados também mostraram aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e KC) frente à infecção e diminuição nos níveis de IL-10 em animais obesos após 48 h. As análises histológicas do intestino indicaram um aumento de áreas de infiltrado inflamatório no intestino de animais obesos no tempo de 48 h. No entanto, de forma interessante, em ambos os grupos, eutrófico e obeso, houve uma redução significativa na área dos infiltrados inflamatórios após 96 h de infecção. Através da análise estrutural da microbiota intestinal, foi possível demonstrar que há diferenças entre os grupos eutrófico e obeso. A estrutura da microbiota intestinal dos animais eutróficos sofreu alterações de forma rápida e continuou variando nos tempos de 24, 48 e 72 h após infecção. Já a alteração na estrutura da microbiota intestinal (MI) de animais obesos foi lenta, com menores alterações nos tempos de 24 e 48 horas, e mudanças expressivas no tempo de 72 h, às quais se aproximaram do perfil microbiano dos animais eutróficos após 24 h de infecção (98,3% de similaridade). Além disso, animais obesos após 96 h de infecção sofrem drásticas alterações na composição da MI

apresentando 55,1% de similaridade com os outros grupos. Alterações na composição da microbiota intestinal e suas associações à doenças infecciosas ainda são fracamente compreendidas o que torna necessária a investigação mais aprofundada acerca de suas interações com o sistema imune.

Palavras-chave: Obesidade. Tuberculose. Microbiota Intestinal. Corpúsculos Lipídicos.

ABSTRACT

Obesity is a current health problem. According to WHO, in 2016, 39% of adults aged 18 years old or older were overweight and 13% were diagnosed with obesity. In Brazil, this scenario is even more worrisome, while data indicate a percentage of overweight adults of 54% and obese individuals of 18.9%, by the Ministry of Health (2019). It has already been shown that obesity or overweight are protective factors in the evolution of infectious diseases such as Tuberculosis (TB). In addition, in individuals with high body mass index (BMI) they have higher systemic levels of pro-inflammatory cytokines and a decrease in anti-inflammatory cytokines. The microbiota composition of eutrophic and obese individuals are different and may influence the development of obesity, as well as having significant role in the modulation of the host immune system. Thus, this study aimed to evaluate the associations between obesity and the gut microbiota in experimental TB. For this, male mice of the C57BL/6 lineage were submitted to a hyperlipidic or standard diet and infected or not with *Mycobacterium bovis* BCG at 24, 48, 72 and 96 hours. Our data demonstrated that the hyperlipidic diet was able to induce obesity after 12 weeks. Interestingly, there was a significant weight loss in obese animals after 96h of infection by *M. bovis* BCG. There was an increase in the formation of lipid bodies in face of infection in both groups studied, but obesity seems to positively modulate this biogenesis in 72 and 96h. However, after 96h of infection, in both groups, there was a significant decrease in the formation of these organelles. Our data also showed increased secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and KC) in face of infection and a decrease in IL-10 levels in obese animals after 48h. Histological analyzes of the gut indicated an increased area of inflammatory infiltrates in the gut of obese animals in 48h. However, interestingly, in both groups, eutrophic and obese, there was a significant reduction in the area of inflammatory infiltrates after 96h of infection. Through the structural analysis of the gut microbiota of the mice, it was possible to demonstrate that there are differences between the eutrophic and obese groups. The gut microbiota (GM) structure of the eutrophic animals underwent changes rapidly and continued to vary at 24, 48 and 72h after infection. The change in the gut microbiota structure of obese animals was slow, with minor changes at 24 and 48 hours, and significant changes in the time of 72h, which approached the microbial profile of the eutrophic animals after 24h of infection. The hyperlipidic diet was able to induce obesity in the animal model

but BCG infection induced loss of body weight after 96h of infection (98.3% similarity). In addition, obese animals after 96h of infection undergo drastic changes in the composition of the GM showing 55.1% similarity with the other groups. Changes in the composition of the gut microbiota and their associations to infectious diseases are still poorly understood and further investigation into their interactions with the immune system are necessary.

Key words: Obesity. Tuberculosis. Gut Microbiota. Lipid Bodies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da obesidade em homens pelo mundo.....	16
Figura 2 – Crescimento do Índice de Obesidade no Brasil.....	17
Figura 3 – O aumento da reserva de lipídios em adipócitos favorece a inflamação..	20
Figura 4 – Representação esquemática da interação entre adipócitos e macrófagos mostrando algumas das moléculas liberadas.....	21
Figura 5 – O consumo excessivo de energia aumenta a inflamação do Tecido Adiposo Branco (White Adipose Tissue – WAT) e contribui para o desenvolvimento da síndrome metabólica.....	22
Figura 6 – Alterações na composição e função da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e microbiota de indivíduos diabéticos-obesos.....	24
Figura 7 – Os filos dominantes em vários locais do trato GI humano.....	25
Figura 8 – Dieta Hiperlipídica induz disbiose da microbiota intestinal e rompimento da integridade epitelial intestinal, influenciando a ativação das imunidades inata e adaptativa, levando ao aumento da resistência à insulina e diabetes do tipo 2 (DM2).....	27
Figura 9 – Estimativa de novos casos de Tuberculose ao redor do mundo.....	29
Figura 10 – Cascata de transmissão da Tuberculose.....	30
Figura 11 – Progressão histológica do granuloma humano durante a Tuberculose..	32
Figura 12 – Granuloma pela infecção por Tuberculose.....	33
Figura 13 – Morfologia Básica do Corpúsculo Lipídico e Proteínas Associadas.....	36
Figura 14 – Biogênese do Corpúsculo Lipídico.....	37
Figura 15 – Desenho Experimental.....	44
Figura 16 – Peso médio dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.....	50
Figura 17 – Índice de Lee dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.....	51
Figura 18 – Comparação entre as gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos eutróficos ou obesos.....	52
Figura 19 – Diferença de peso final e peso inicial dos animais tratados com dieta hiperlipídica ou padrão.....	53

Figura 20 – Peso corporal dos camundongos eutróficos e obesos após infecção por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	54
Figura 21 – Contagem da migração celular em camundongos eutróficos e obesos durante a infecção experimental por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG em 24, 48, 72 e 96 h.....	55
Figura 22 – Formação de Corpúsculos Lipídicos nas células do lavado pleural após 24, 48, 72 ou 96h de infecção por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	56
Figura 23 – Estudo da síntese de TNF- α e KC produzidas por leucócitos pleurais infectados ou não por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção.....	57
Figura 24 – Estudo da síntese de IL-10 por leucócitos pleurais infectados ou não por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção.....	58
Figura 25 – Infiltrado inflamatório na porção final do intestino de camundongos eutróficos e obesos infectados ou não por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h.....	60
Figura 26 – Análise da composição estrutural da microbiota de camundongos eutróficos ou obesos, infectados ou não por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG nos tempos de 0, 24, 48 e 72h.....	62
Figura 27 – Análise da composição estrutural da microbiota de camundongos eutróficos ou obesos, infectados ou não por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG nos tempos de 0, 24, 48, 72 h e 96 h.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos animais em grupos por experimento.....	43
Tabela 2 – Composição da ração hiperlipídica.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADRP	Adipose Differentiation-Related Protein (Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos)
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
BCG	Bacilo de Calmett-Guérin
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Soro Bovina)
CD	Cluster Of Differentiation (Grupo de Diferenciação)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL	Corpúsculo Lipídico
COX	Ciclooxigenase
CTM	Células-tronco mesenquimais
DAPI	4'6'-diamidino-2- fenilindol
DC	Dendritic Cell (Célula Dendrítica)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EPM	Erro Padrão Médio
GC	Gordura Corporal
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus Da Imunodeficiência Humana)
I.T.	Intratorácico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRF	Interferon Regulatory Factors (Fatores Reguladores De Interferon)
KC	Keratinocyte Chemoattractant (Quimioatraente de queratinócito)
KO	Knockout (Nocaute)
LAM	Lipoarabinomanana
LO	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MR	Mannose Receptor (Receptor De Manose)

mTOR	Mammalian Target of Rapamycin (Alvo Da Rapamicina Em Mamíferos)
PAT	Família Composta Por Perilipina, ADRP e TIP47
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Tampão Fosfatado Salino)
PFA	Paraformaldeído
PG	Prostaglandina
PLIN	Perilipina
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos)
RE	Retículo Endoplasmático
TB	Tuberculose
TGF	Transforming Growth Factor (Fator De Transformação Do Crescimento)
TLR	Toll-Like Receptors (Receptores Semelhantes À Toll)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator De Necrose Tumoral)
UFC	Unidade Formadora De Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBESIDADE.....	16
1.1.1	Características Gerais	16
1.1.2	Influência da Obesidade no Sistema Imunológico	18
1.2	MICROBIOTA INTESTINAL.....	24
1.3	TUBERCULOSE.....	28
1.4	CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	34
1.4.1	Características Gerais e Biogênese	34
1.4.2	Corpúsculos Lipídicos e seu papel em Infecções micobacterianas	39
2	OBJETIVOS	42
2.1	OBJETIVO GERAL.....	42
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	43
3.2	INDUÇÃO DA OBESIDADE.....	44
3.3	INFECÇÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> , BCG.....	45
3.4	PLEURISIA INDUZIDA POR BCG.....	45
3.5	AQUISIÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	46
3.6	CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS.....	46
3.7	COLORAÇÃO E CONTAGEM DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	46
3.8	DOSAGEM DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E ADIPOCINAS.....	47
3.9	HISTOLOGIA.....	47
3.10	ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	48
3.10.1	Extração de DNA	48
3.10.2	Técnica de rep-PCR	48
3.10.3	Análises <i>fingerprints</i>	49

3.11	ESTATÍSTICA.....	49
4	RESULTADOS	50
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Esta sessão foi subdividida em quatro capítulos: “Obesidade”, “Microbiota Intestinal”, “Tuberculose” e “Corpúsculos Lipídicos”.

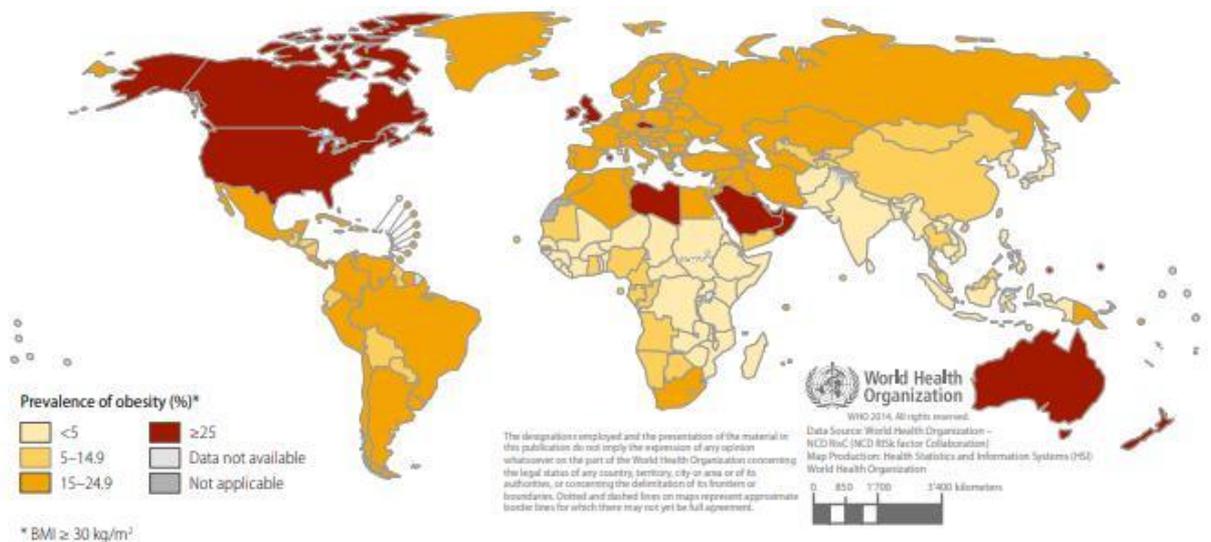
1.1 OBESIDADE

Esta sessão foi subdividida em “características gerais” e “influência da obesidade no sistema imunológico” para melhor compreensão do assunto.

1.1.1 Características Gerais

A obesidade é uma doença que atinge pessoas no mundo inteiro e tornou-se um problema de saúde contemporâneo, já que sua incidência quase triplicou desde 1975, segundo a Organização Mundial de Saúde. Em 2016, 39% dos adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso e 13% foram diagnosticados com obesidade (Figura 1). Levando-se em consideração que a maior parte da população mundial vive em países em que o sobrepeso, ou a obesidade, matam mais do que a subnutrição é de suma importância ressaltar que esta é uma doença evitável e, portanto, deve ser melhor compreendida (WHO, 2018).

Figura 1 - Distribuição da obesidade em homens pelo mundo.



Fonte: Adaptado de Relatório Global de Status sobre Doenças Não Transmissíveis, 2014, Organização Mundial da Saúde.

O cenário da frequência de obesidade na população brasileira é ainda mais alarmante, a proporção de indivíduos adultos com sobrepeso foi de 54% e de indivíduos obesos chegou a 18,9% segundo dados do Ministério da Saúde, 2019 (Figura 2). A baixa ingestão de alimentos ricos em fibras e vitaminas, como frutas e hortaliças, e aumento do consumo de alimentos com baixo valor nutricional e ricos em gorduras e açúcares é crescente desde a virada do século, concomitantemente à diminuição de prática de atividades físicas que contribuem para as estatísticas atuais de sobrepeso e obesidade, que só tendem a aumentar.

Figura 2 - Crescimento do Índice de Obesidade no Brasil.



Fonte: Vigitel, 2016.

A obesidade é uma doença multifatorial em que, além da dieta, outros fatores como a idade e estágio de desenvolvimento do indivíduo, fatores genéticos e epigenéticos, prática de atividade física, nível de instrução e educação nutricional, e doenças psicológicas estão envolvidos (KOPELMAN, 2000; CHRISTAKIS; FOWLER, 2007; PANIAGUA, 2016).

A obesidade é estimada através do Índice de Massa Corporal (IMC), em que se faz o cálculo da razão do peso (em quilogramas) do indivíduo, pelo quadrado da sua altura, que é expressa em metros. Segundo abordagem da OMS, indivíduos com IMC entre 25-29,9 kg/m^2 são considerados com sobrepeso e IMC igual ou superior a

30 kg/m² são classificados como obesos (AN et al., 1998; WANG et al., 2012; PANIAGUA, 2016). Esta estimativa, no entanto, não fornece informações quanto à composição corporal e distribuição de gordura corporal, tampouco leva em consideração as variações individuais da relação massa muscular / deposição de gordura. Desta forma, a predição de obesidade é mais adequada quando medido o percentual de gordura corporal (% GC), que é a razão entre o peso total e o peso de gordura corporal (PANIAGUA, 2016).

A obesidade é o principal fator da chamada “Síndrome Metabólica”, caracterizada pela incidência de fatores de risco à saúde do indivíduo que podem coexistir e contribuir para diversas patologias, como resistência à insulina, dislipidemia, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, inflamação, hipertensão, intolerância à glicose e esteatose hepática (DE HEREDIA et al, 2012; HELLMANN et al., 2013; EGUCHI et al., 2017).

1.1.2 Influência da Obesidade no Sistema Imunológico

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e diminuição do gasto energético, levando à hipertrofia do tecido adiposo que normalmente está associada a outros problemas de saúde, amplificando sua gravidade (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

O tecido adiposo é responsável por liberar vários peptídeos bioativos dentre os quais alguns são capazes de atuar como hormônios (LAFONTAN, 2005). Destacam-se entre as citocinas e adipocinas: a leptina, a adiponectina, a adipsina, a resistina, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), o fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), a proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) a visfatina, entre outros. Todos esses fatores, com exceção da adiponectina, tem sua produção e secreção intensificadas durante obesidade (MAURY; BRICHARD, 2010; PANIAGUA, 2016; ENGIN; ENGIN, 2017; LONGO et al., 2019)(ENGIN; ENGIN, 2017).

Vários destes fatores, como o TNF- α , a resistina, o PAI-1, a IL-6 e a MCP1, influenciam diretamente na indução de resistência à insulina, a hipercoagulabilidade e a aterogênese, que, por sua vez, geram hipertensão, intensificam estados pró-inflamatórios, aumentam riscos cardiovasculares, acidentes tromboembólicos,

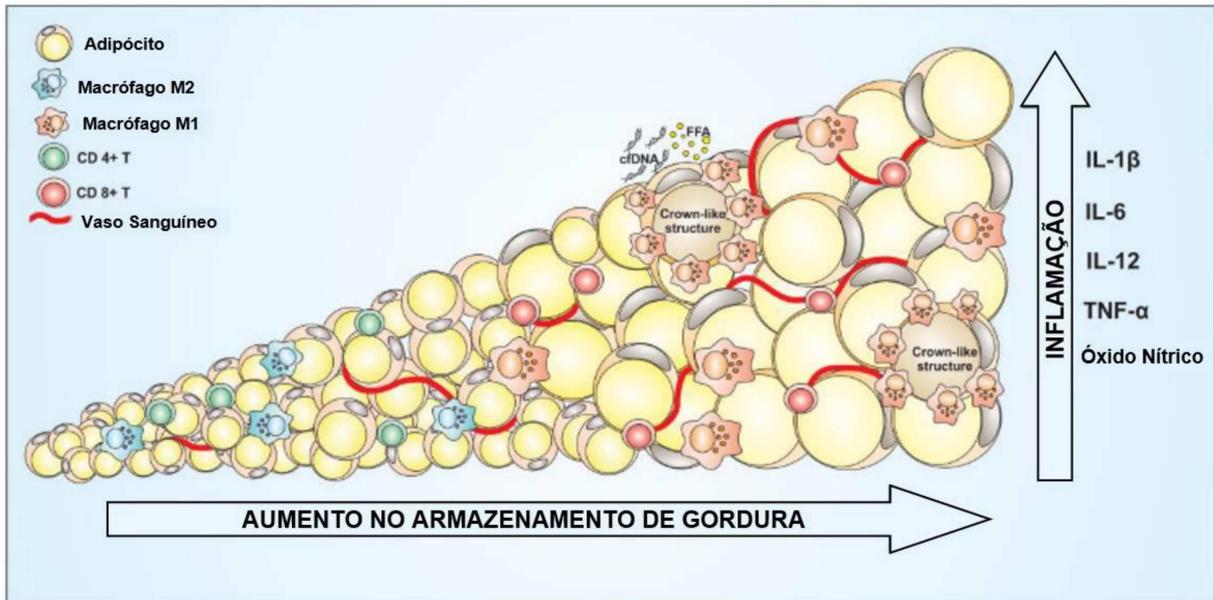
diabetes tipo 2 (DM2), esteatose hepática, neurodegeneração, doença biliar e certos tipos de câncer (HOTAMISLIGIL, 2006).

Diante da descoberta de que a obesidade resulta em um estado inflamatório no tecido adiposo, no fígado, no músculo, no pâncreas e no cérebro, estudos acerca dos mecanismos inflamatórios na obesidade têm atraído os pesquisadores (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

O termo metainflamação, define a inflamação crônica e de baixo grau conduzida por adipócitos em resposta ao excesso de nutrientes, como em quadros de obesidade contribuindo para a resistência à insulina e disfunção do metabolismo. Durante a metainflamação, inúmeras citocinas e adipocinas são produzidas pelo tecido adiposo branco (TAB), levando ao recrutamento de células imunes para esse tecido e uma sólida ativação do sistema imunológico (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; ENGIN, 2017).

Em condições normais, os macrófagos residentes predominantes no tecido adiposo são os macrófagos alternativamente ativados (M2). A ativação destes macrófagos ocorre por exposição à IL-4 e possuem papel de imunossupressão e homeostase tecidual, secretando citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e agonistas do receptor de IL-1 (BOUTENS; STIENSTRA, 2016). No tecido adiposo de obesos há um aumento no número de macrófagos. Em camundongos o número de macrófagos em relação ao número de adipócitos passa de 5% em animais eutróficos para 50% em obesos (WEISBERG et al., 2003; BOUTENS; STIENSTRA, 2016), e em humanos 4% das células presentes no tecido adiposo visceral de indivíduos magros são macrófagos, e 12% em obesos (HARMAN-BOEHM et al., 2007). Além disso, durante a obesidade há um aumento na proporção de macrófagos classicamente ativados (M1) em relação ao número de macrófagos M2. Macrófagos M1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-12, e promovem um estado inflamatório também através da secreção de Óxido Nítrico (Figura 3).

Figura 3 - O aumento da reserva de lipídios em adipócitos favorece a inflamação.



Fonte: Adaptado de Correa *et al.*, 2019.

Pessoas obesas (IMC >.30 kg/m²) possuem concentrações sistêmicas de mediadores pró-inflamatórios maiores quando comparados às pessoas na faixa normal de peso (HERDER *et al.*, 2005, 2006; CALDER *et al.*, 2011).

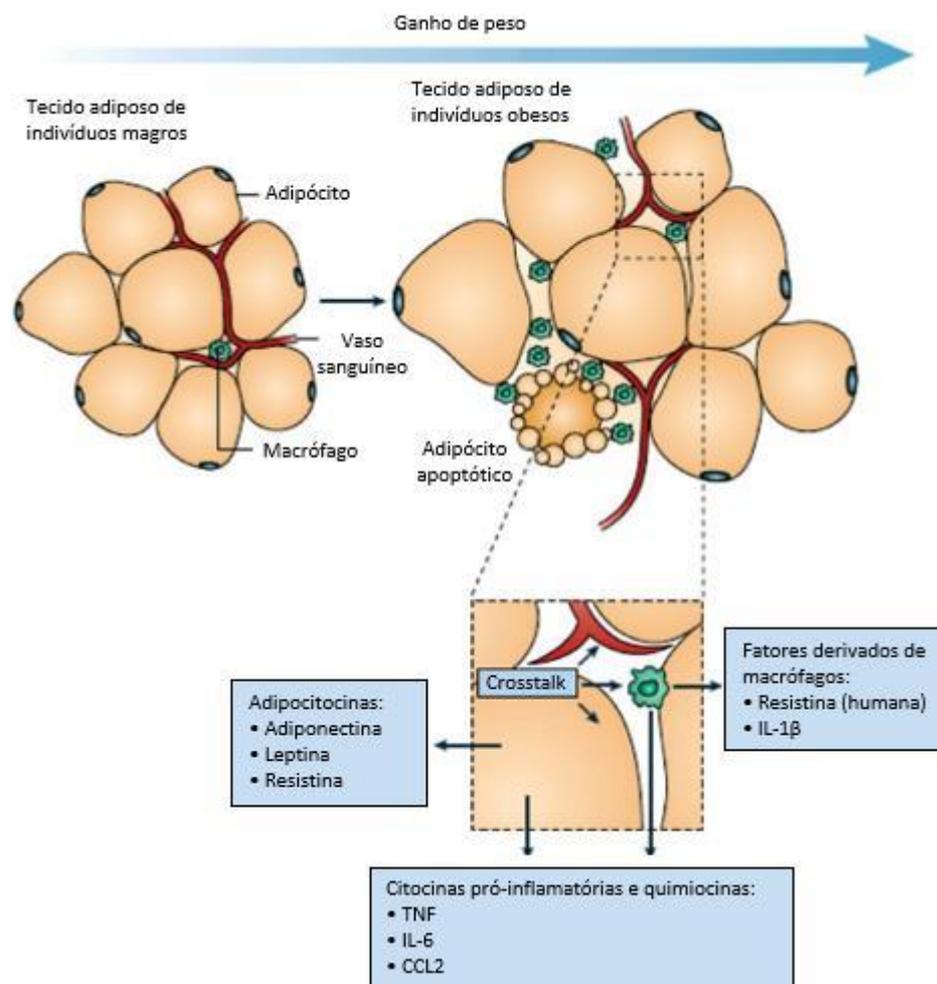
Já foi observado que, tanto em humanos quanto em roedores, monócitos e macrófagos se acumulam no tecido adiposo quando ocorre aumento do peso corporal e a prevenção ou reversão dessa acumulação protege contra a disfunção metabólica relacionada à obesidade, porém os mecanismos patogênicos que resultam neste recrutamento ainda estão sendo investigados e exigem maiores estudos (WEISBERG *et al.*, 2003; HEVENER *et al.*, 2007; LUMENG *et al.*, 2007; EGUCHI *et al.*, 2017).

Macrófagos derivados do tecido adiposo estão ligados à manutenção do estado inflamatório de baixo grau causado pela obesidade (Figura 4), sendo os fatores que levam à infiltração e ativação destas células de caráter multifatorial, como sinais parácrinos, autócrinos e endócrinos, além de modificações mecânicas, como hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos (CURAT *et al.*, 2006; CALDER *et al.*, 2011).

O influxo de células do sistema imune para o tecido adiposo contribui para a manutenção do estado inflamatório, e é possível observar que a obesidade induz os macrófagos a um perfil predominantemente pró-inflamatório, caracterizada por uma redução na secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e da arginase, e aumento das pró-inflamatórias, como TNF- α (LUMENG *et al.*, 2007; KALUPAHANA *et al.*, 2012).

Além de citocinas clássicas, a leptina e a adiponectina são hormônios produzidos no tecido adiposo, exclusivamente por adipócitos, e estas podem exercer papel importante na atração de células inflamatórias. Estudos realizados *in vitro* já sugeriram que a leptina é uma facilitadora da migração de monócitos devido à sua capacidade de induzir proteínas de adesão (CURAT et al., 2004), entretanto, a inibição desse processo pode ser realizada pela adiponectina (GUZIK et al., 2006). Em indivíduos obesos foi observado aumento dos níveis de leptina e uma diminuição dos níveis de adiponectina (CALDER et al., 2011; PANIAGUA et al., 2014; PANIAGUA, 2016).

Figura 4 - Representação esquemática da interação entre adipócitos e macrófagos mostrando algumas das moléculas liberadas.



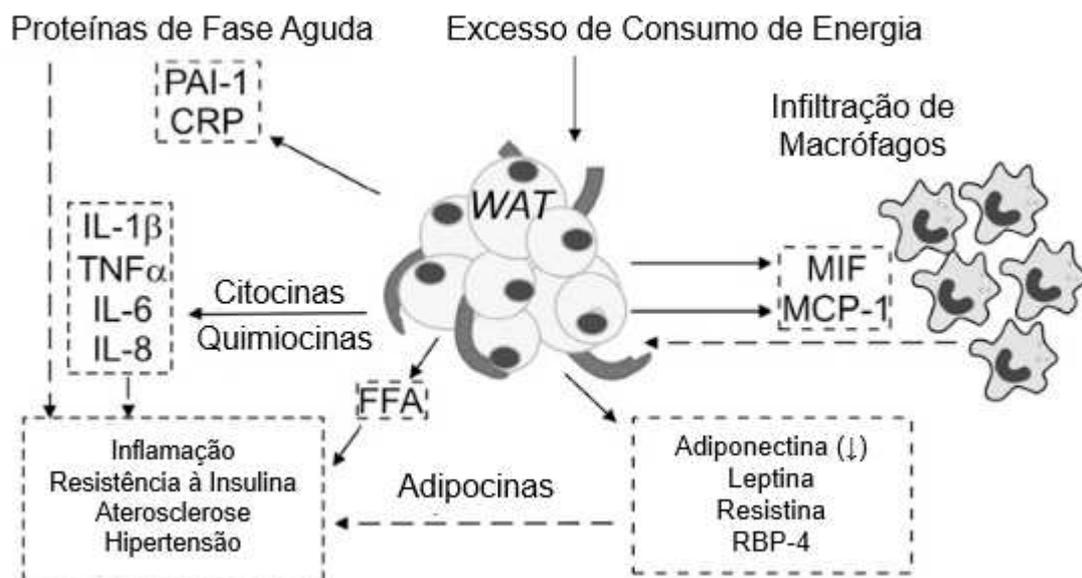
Fonte: Adaptado de Calder *et al.*, 2011.

O consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados é altamente correlacionada à síndrome metabólica (Figura 5), em que ocorre ganho de peso e

aumento da inflamação (KENNEDY et al., 2008). Além disso, eles são capazes de modular a atividade de fatores de transcrição envolvidos na inflamação, como NFκB e PPARγ (CALDER et al., 2011). Este é o caso do palmitato (um dos ácidos graxos saturados mais comuns encontrados tanto em animais, quanto em plantas) que, quando em excesso, leva à expansão do tecido adiposo branco e aumento da inflamação e da apoptose através do estresse oxidativo do retículo ou endoplasmático, além de geração de ceramida e espécies reativas de oxigênio (ROS) e sinalização da proteína quinase C (KENNEDY et al., 2008).

Os adipócitos expressam uma série de receptores Toll-Like (TLR) que são capazes de detectar lipídios e ácidos graxos saturados, além de induzir ativação de TLR2 e TLR4 (RAY et al, 2016). Em indivíduos obesos, observa-se aumento da expressão de TLR4 e consequente ativação da via NFκB e produção de citocinas inflamatórias (KENNEDY et al., 2008; SCHÄFFLER e SCHÖLMERICH, 2010).

Figura 5 - O consumo excessivo de energia aumenta a inflamação do Tecido Adiposo Branco (White Adipose Tissue – WAT) e contribui para o desenvolvimento da síndrome metabólica.



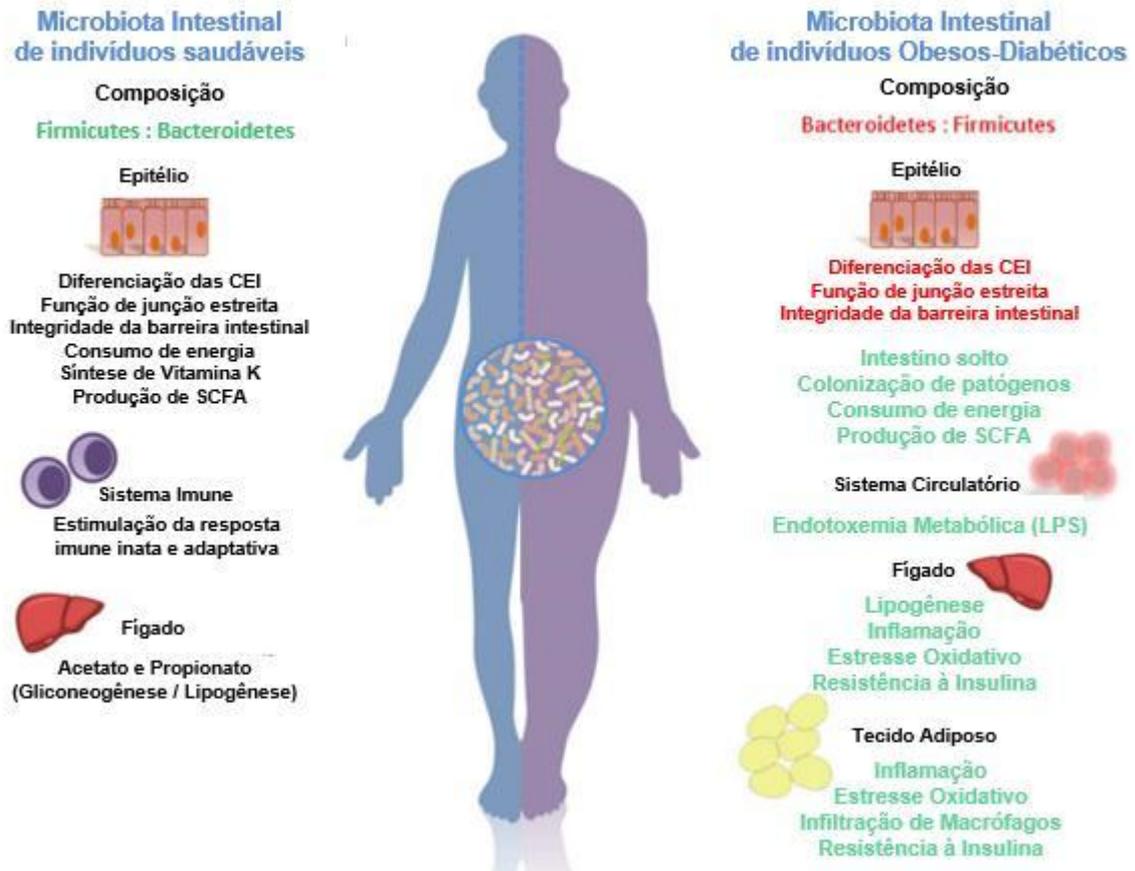
Fonte: Adaptado de Kennedy et al., 2008.

Estudos já demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, quimiocinas, como a MCP-1, e adipocinas, como a leptina e adiponectina, possuem uma relação estreita com a obesidade (HELLMANN et al., 2013; PANIAGUA, 2016; RAY et al, 2016). A primeira correlação entre obesidade e baixo estado inflamatório

foi proposto por Hotamisligil *et al.* (1993), que demonstraram que o tecido adiposo branco é capaz de sintetizar e liberar TNF- α , uma importante citocina pró-inflamatória. Neste estudo realizado em camundongos, foi demonstrado que a expressão de TNF- α é aumentada em adipócitos de camundongos obesos, assim como em resistentes à insulina. Esses dados corroboram com a premissa de que o tecido adiposo possui papel importante na imunidade, podendo ser a maior fonte de mediadores pró-inflamatórios quando há uma desregulação proveniente da obesidade (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; CALDER *et al.*, 2011). Atualmente, sabe-se que não somente TNF- α , mas uma série de citocinas inflamatórias aumentam nos tecidos de obesos, dentre elas destaca-se a IL-6, IL-1 β , CCL2 e outras (BERG; SCHERER, 2005; SHOELSON *et al.*, 2006).

Um importante papel da obesidade que vem sendo cada vez mais investigado é quanto à sua influência na composição da microbiota intestinal (MI) (Figura 6). Já foi demonstrado que a alimentação exerce papel influente na MI tanto em animais (MURPHY *et al.*, 2010; DE WIT *et al.*, 2012; MUJICO *et al.*, 2013; PATTERSON *et al.*, 2014; DANIEL *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2015), quanto em humanos (DE FILIPPO *et al.*, 2010; TURNBAUGH *et al.*, 2010; GRAF *et al.*, 2015; KNIGHT, 2015). Desta forma, investigações acerca de dietas ricas em gorduras apontaram mudanças na composição microbiana intestinal que estão relacionadas a efeitos prejudiciais na saúde dos indivíduos (TURNBAUGH *et al.*, 2010).

Figura 6 - Alterações na composição e função da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e microbiota de indivíduos diabéticos-obesos.



Fonte: Adaptado de Patterson et al., 2016.

Uma vez que mudanças na composição da microbiota intestinal exercem grande influência nas respostas à diversas patologias, o estudo dessas alterações e suas respectivas modulações do sistema imune devem ser amplamente investigadas como um possível alvo terapêutico para tratamentos futuros.

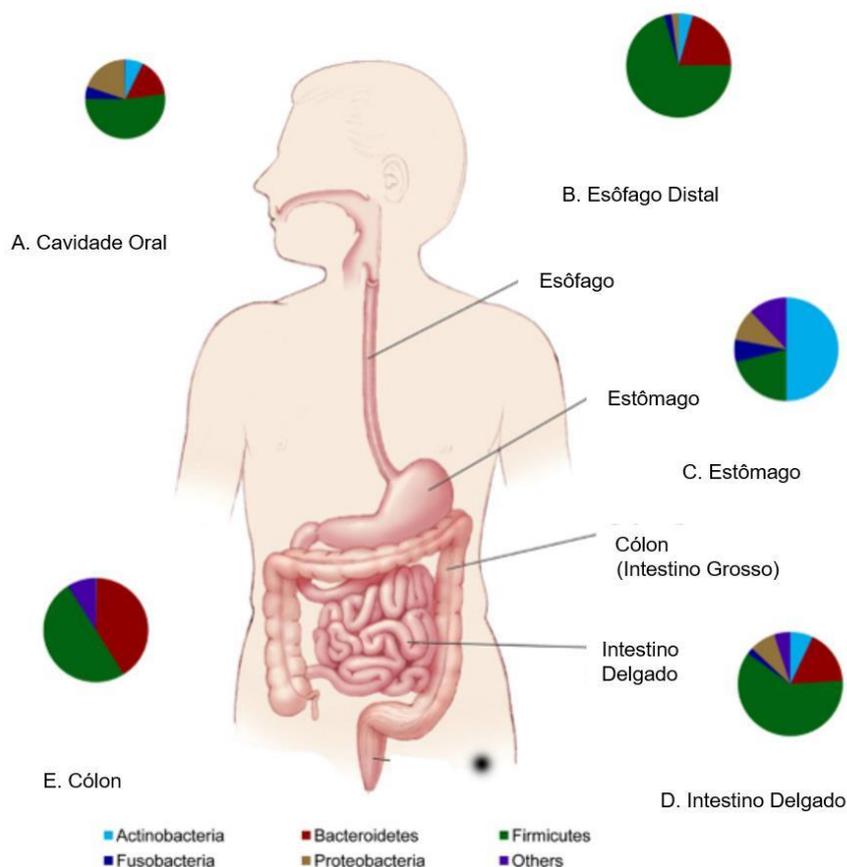
1.2 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota humana é formada por uma população diversa, numerosa, complexa que interage entre si e com células do hospedeiro. Nesse contexto, a microbiota intestinal se destaca por ser a mais numerosa e por impactar profundamente a fisiologia do hospedeiro (FOMBY; CHERLIN, 2011). A MI possui influência no desenvolvimento e expansão das células imunológicas da mucosa do

hospedeiro e o sistema imunológico modula a composição da MI (HOOPER et al., 2007; LEE; MAZMANIAN, 2011).

A microbiota intestinal caracteriza-se por todos os microrganismos residentes do intestino, sendo estes as bactérias, archaea, fungos, protozoários e vírus (SITTIPO et al., 2018; KLANCIC; REIMER, 2019). Estima-se que existam em torno de 100 trilhões de células em sua composição (FOMBY; CHERLIN, 2011; KLANCIC; REIMER, 2019) e estima-se que estejam na mesma ordem de magnitude de células humanas (BLASER; DOMINGUEZ-BELLO, 2016). A comunidade dominante é das bactérias, com mais de 90% das suas espécies pertencentes aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e, além desses, já foram descritos também os filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, e *Verrucomicrobia* na microbiota intestinal (Figura 7) (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012).

Figura 7 - Os filos dominantes em vários locais do trato GI humano.



Fonte: Todos os direitos reservados à Mayo Foundation for Medical Education and Research. Adaptado de Dave et al., 2012.

Estudos acerca do papel da MI na fisiologia dos indivíduos têm aumentado, uma vez que ela é responsável por exercer diversas funções no metabolismo de

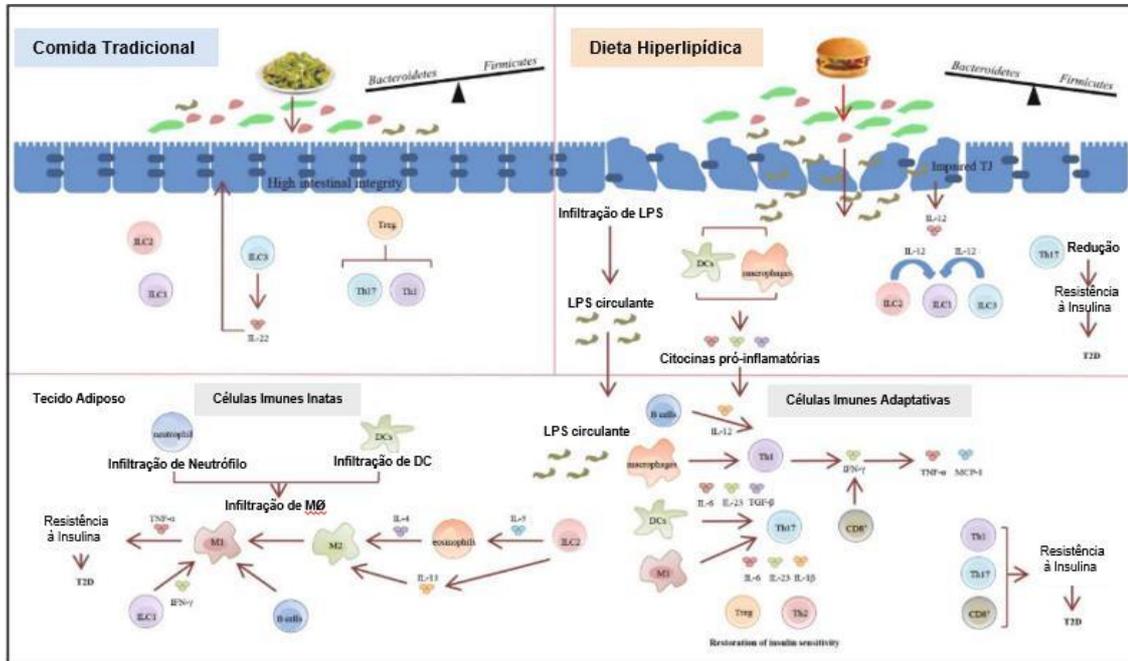
maneira geral, como na digestão dos alimentos, fornecimento de nutrientes essenciais ao hospedeiro, defesa contra patógenos e controle do crescimento e diferenciação de células epiteliais intestinais (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; SITTIPO et al., 2018).

Quando em equilíbrio, a comunicação entre a microbiota intestinal e o sistema imune ocorre em homeostase e nenhuma doença, inclusive as de origem metabólica, é desencadeada por este fenômeno (JIN; HENAO-MEJIA; FLAVELL, 2013; THAISS et al., 2016). Entretanto, mudanças na composição da microbiota intestinal, conhecida como disbiose, tem sido associada à patogênese de diversas doenças, tais como doenças cardiovasculares (WANG et al., 2011), aterosclerose (TANG et al., 2017), diabetes do tipo 2 (HAN; LIN, 2014) e obesidade (BÄCKHED et al., 2004, 2007). Além disso, o consumo de dieta *high-fat* (HFD), ou hiperlipídica, pode ser responsável pela infiltração ou ativação de macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos e levar à uma diminuição de eosinófilos no tecido adiposo que juntos levarão ao desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina (Figura 8) (SITTIPO et al., 2018).

A influência da microbiota intestinal na função e desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro já é bem estabelecida, possuindo caráter fundamental para sua indução, treinamento e desempenho. Camundongos *Germ-free* (nascidos e criados na ausência total de microrganismos) são ferramentas importantes na investigação e compreensão do papel da MI na fisiologia do hospedeiro (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012). Em estudo realizado com esse modelo de camundongo foi observado que esses animais são deficientes no desenvolvimento do tecido linfático associado ao intestino (GALT), que é a primeira linha de defesa da mucosa intestinal (MACPHERSON; HARRIS, 2004; PATTERSON et al., 2016).

Camundongos *germ-free* também foram utilizados como modelo para esclarecer o papel da MI na obtenção de energia e deposição de gordura, em que foi observado uma diminuição de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) no intestino e excreção do dobro de calorias em comparação aos camundongos convencionais. Para compensar essa coleta mais baixa de energia, os camundongos *germ-free* aumentaram seu consumo de alimento (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012).

Figura 8 - Dieta Hiperlipídica induz disbiose da microbiota intestinal e rompimento da integridade epitelial intestinal, influenciando a ativação das imunidades inata e adaptativa, levando ao aumento da resistência à insulina e diabetes do tipo 2 (DM2).



Fonte: Adaptado de Sittipo *et al.*, 2018.

Em experimento realizado com camundongos *ob/ob*, geneticamente modificados para desenvolver obesidade, foi observado que estes animais eram hiperfágicos devido à uma mutação no gene que codifica a leptina, hormônio responsável pela saciedade (LEY *et al.*, 2005).

A microbiota intestinal de humanos obesos já foi descrita como alterada em comparação aos indivíduos eutróficos (LEY *et al.*, 2006). Foi observado tanto em camundongos quanto em humanos que existe um desbalanço entre os filos dominantes que compõe a microbiota intestinal, havendo aumento de *Firmicutes* e diminuição de *Bacteroidetes* em obesos quando comparados aos eutróficos (LEY *et al.*, 2005, 2006; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012).

Em camundongos e humanos, através de análise metagenômica de amostras fecais, foi possível concluir que a microbiota intestinal de indivíduos obesos tem maior capacidade de degradação dos polissacarídeos, ou seja, maior extração de energia (TURNBAUGH *et al.*, 2006, 2009).

O consumo de dieta hiperlipídica (HFD) também contribui para o rompimento da barreira epitelial intestinal que promove o aumento da circulação de lipopolissacarídeos (LPS), ativação de células do sistema imune intestinais e,

consequentemente, aumento de citocinas pró-inflamatórias, dessa forma, pode promover respostas imunológicas locais e sistêmicas e afetar ainda mais o metabolismo do hospedeiro (CAESAR et al., 2012; SITTIPO et al., 2018).

Lesões na barreira intestinal pelo consumo de HFD e consequente circulação de LPS influenciam na progressão da obesidade e no desenvolvimento da resistência à insulina em diabetes tipo 2 (DING et al., 2010). Em camundongos alimentados com HFD foi demonstrado aumento da inflamação do seu tecido adiposo (VAN DER HEIJDEN et al., 2015).

A citocina IL-12 é produzida em casos de lesões da barreira epitelial intestinal e induz a diferenciação de células linfoides intatas (ILCs) para ILC1, que em resposta produz a citocina pró-inflamatória interferon- γ (IFN- γ) (SPITS; BERNINK; LANIER, 2016). O IFN- γ , por sua vez, estimula a polarização de macrófagos M2 (anti-inflamatório) a macrófagos M1 (pró-inflamatórios) e a resistência à insulina (O'SULLIVAN et al., 2017).

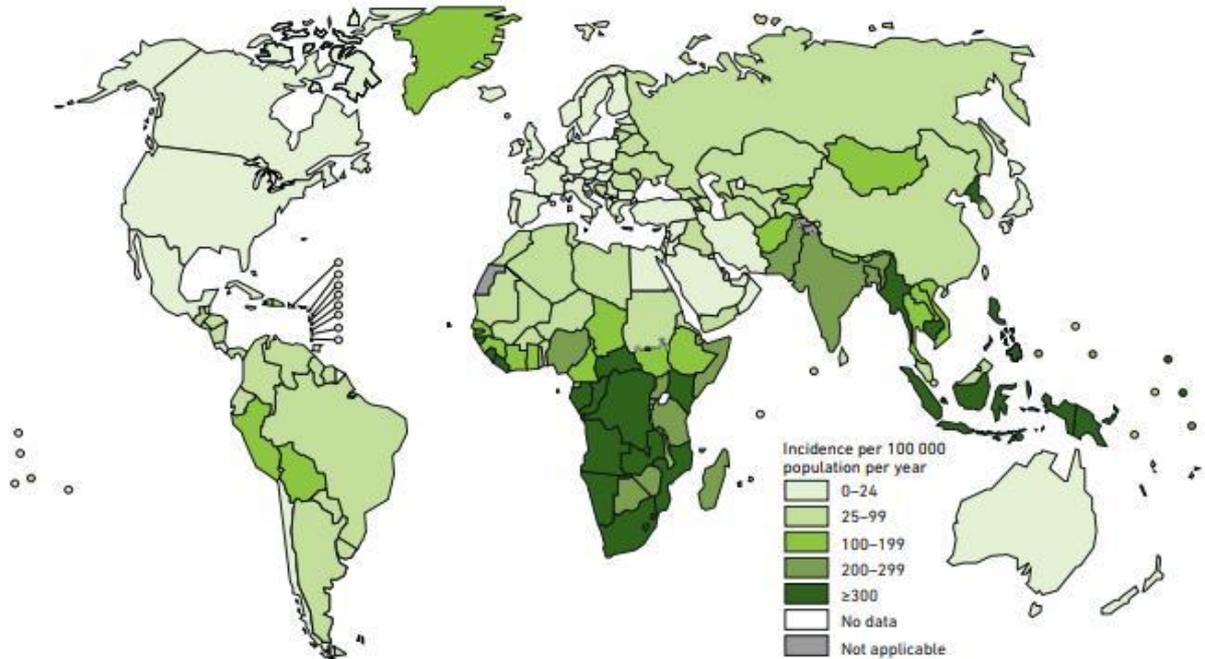
Doenças infecciosas como a tuberculose (TB) também são capazes de levar à disbiose da microbiota intestinal. HU et al. (2019) demonstraram, através de sequenciamento metagenômico, significativa alteração da microbiota intestinal e suas funções metabólicas de pacientes com TB. Entretanto, ainda é proposta a possibilidade dessa alteração ter ocorrido anteriormente à infecção e ainda contribuir para a mesma.

A microbiota intestinal, portanto, possui funções amplamente diversas dentre as quais destaca-se seu papel na resposta imunológica em diversas doenças interferindo diretamente na resposta do hospedeiro. Desta forma, as associações entre a microbiota e estado nutricional do indivíduo podem ter impacto direto para o desenvolvimento ou não de determinadas doenças, inclusive a Tuberculose.

1.3 TUBERCULOSE

A Tuberculose (TB) é uma doença causada pela micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* e é considerada um problema de saúde mundial (Figura 9), uma vez que está entre as 10 principais causas de morte por doenças infecciosas, sendo a maior causadora de mortes quando proveniente de um único agente infeccioso, ficando à frente, inclusive, da infecção pelo vírus do HIV (OMS, 2018).

Figura 9 - Estimativa de novos casos de Tuberculose ao redor do mundo.



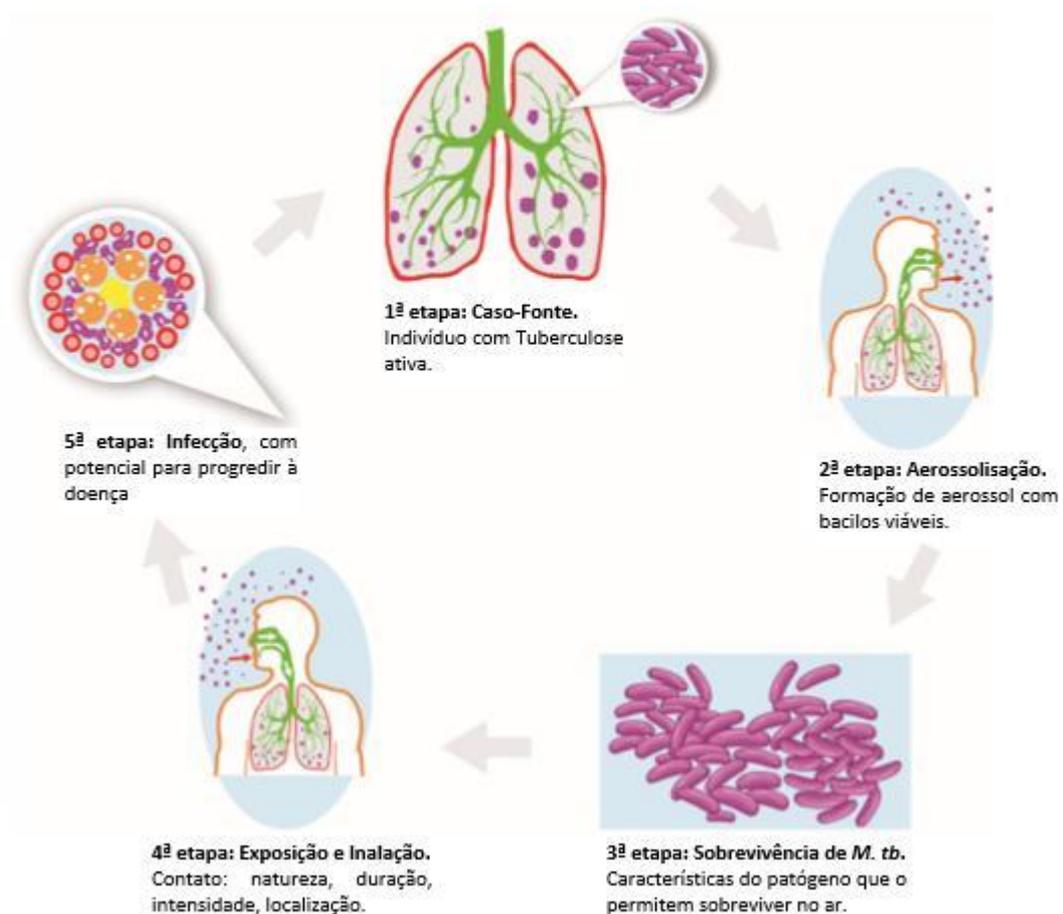
Fonte: Adaptado de Global Tuberculosis Report, 2018, Organização Mundial da Saúde.

As consequências advindas da infecção por *M. tuberculosis* e suas manifestações clínicas dependem de uma série de fatores correlacionados, como a genética do hospedeiro, fatores de virulência, a saúde e o estado nutricional do hospedeiro e possíveis exposições prévias ao patógeno ou imunização contra o mesmo através da vacinação (LERNER et al, 2015).

A transmissão do *M. tuberculosis* ocorre pela via aérea, quando uma pessoa com a doença ativa ao espirrar, tossir ou mesmo durante sua fala, libera partículas contendo os bacilos infectantes que podem ser inaladas por outras pessoas infectando-as (Figura 10) (O’GARRA et al., 2013; CASPER et al., 2017). Entretanto, a exposição ao *M. tuberculosis* não necessariamente levará o paciente ao desenvolvimento da forma ativa/sintomática da doença. Apenas 30% das pessoas são infectadas quando expostas ao agente etiológico da doença e este também evento depende do grau de exposição, como proximidade, condições do ambiente e tempo de convivência, da infectividade do caso índice (quantidade de bacilos eliminados) e fatores imunológicos individuais. Em sua maioria, pessoas infectadas permanecem saudáveis por anos devido à contenção do bacilo pelo sistema imune do hospedeiro,

caracterizando o estado de infecção por tuberculose latente (LTB) (GETAHUN et al., 2015).

Figura 10 - Cascata de transmissão da tuberculose.



Fonte: Adaptado de Churchyard et al., 2017.

A infecção por *M. tuberculosis* geralmente resulta em um estado latente e assintomático (LTB), em que não há evidência de doença e a única indicação de infecção é a presença de resposta imunológica a antígenos micobacterianos. Apenas uma fração de 5 a 10% desses indivíduos infectados realmente evoluem para TB ativa durante sua vida, em que a carga bacteriana é alta e a transmissão pode ocorrer (PHILIPS e ERNST, 2012; ANURADHAA et al, 2016).

A tuberculose é uma doença que acomete principalmente os pulmões (TB pulmonar), mas pode também apresentar outros sítios de infecção (TB extrapulmonar). Neste segundo caso, a doença é mais comum em pacientes imunocomprometidos, atingindo, principalmente, crianças e indivíduos portadores do vírus HIV (OMS, 2018).

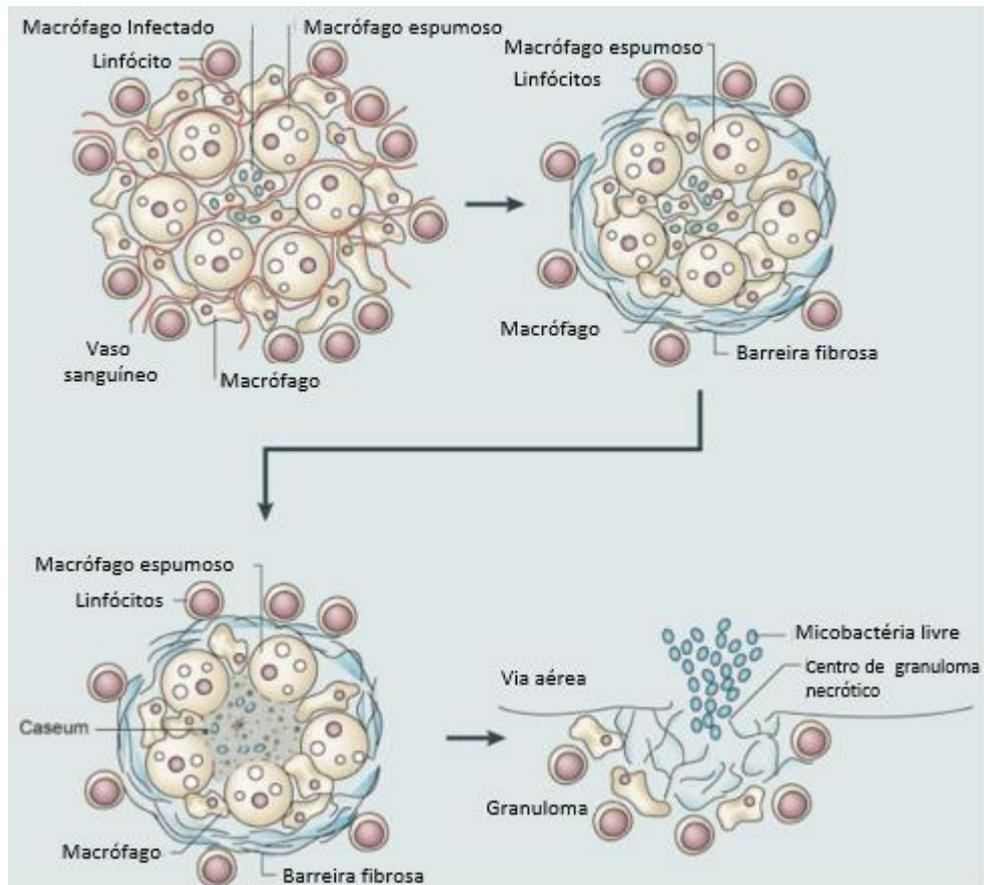
A TB é uma doença negligenciada, porém, devido à sua ressurgência em países do mundo todo, ela tem causado imensa preocupação por parte destes ganhando cada vez mais destaque no campo da pesquisa. Nesse sentido, investigações quanto à defesa do hospedeiro e mecanismos celulares e moleculares envolvidos na infecção por *M. tuberculosis* têm sido alvo desses estudos.

A vacina atualmente utilizada na prevenção contra infecção por tuberculose é a *Mycobacterium bovis-bacillus* Calmette-Guérin (BCG), já utilizada há mais de 90 anos, mas que infelizmente é incapaz de garantir que indivíduos adultos não desenvolvam a doença pulmonar. Portanto, para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes se faz necessário o estudo mais aprofundado da patogênese da doença (PHILIPS e ERNST, 2012).

A capacidade dessa micobactéria em se adaptar a ambientes hostis de macrófagos tem sido de suma importância para a sobrevivência desses organismos e conferido sucesso na sua patogenia. Uma vez no organismo, a *M. tuberculosis* é capaz de interferir no tráfego de vias do hospedeiro através da modulação da maturação de vias endossomais e fagossomais a fim de criar um potencial nicho de sobrevivência em fagossomos micobacterianos (ARMSTRONG; D'ARCY HART, 1975; RUSSELL, 2011; RUSSELL; MWANDUMBA; RHOADES, 2002).

Um aspecto muito comum durante o processo infeccioso da tuberculose é a formação de granulomas, que são aglomerados organizados de macrófagos infectados rodeados por diversas outras células como linfócitos, monócitos e células epiteliais que também são componentes do sistema imune (Figura 11).

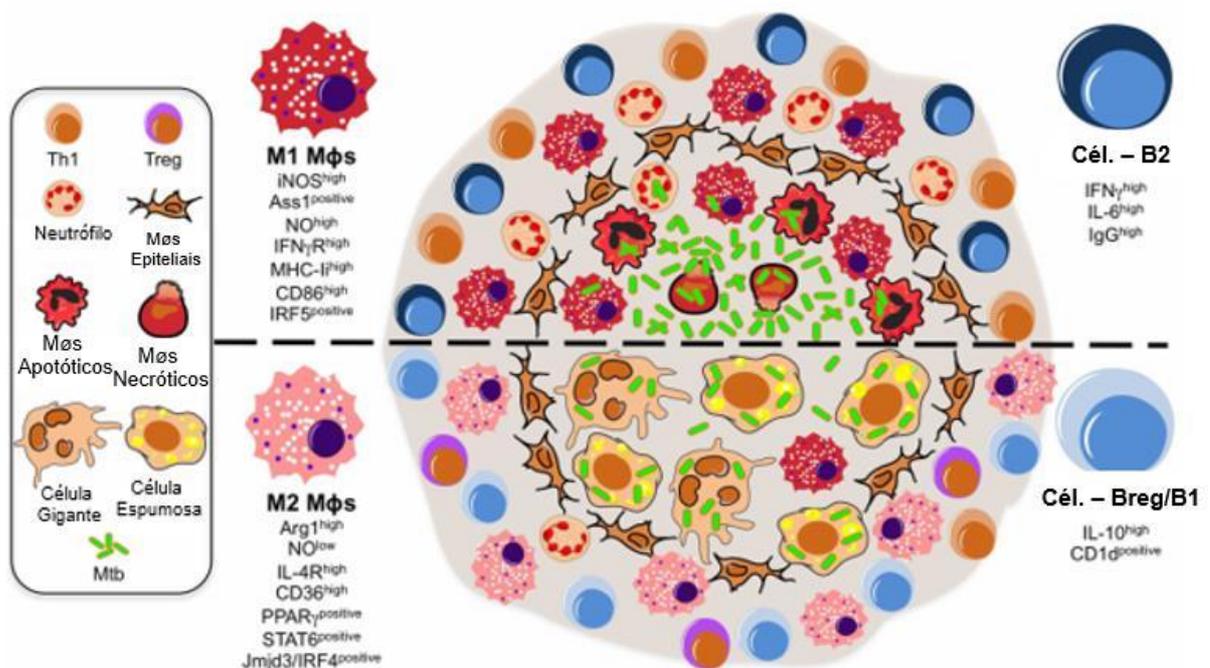
Figura 11 - Progressão histológica do granuloma humano durante a Tuberculose.



Fonte: Adaptado de Russell *et al.*, 2010.

Nos granulomas também destacam-se os “macrófagos espumosos”, caracterizados pelo acúmulo intracelular de lipídios ou corpúsculos lipídicos, e que perderam a habilidade bactericida e fagocítica (Figura 12).

Figura 12 - Granuloma pela infecção por tuberculose.



Fonte: Adaptado de Lugo-Villarino *et al.*, 2013.

Já é bem estabelecido que citocinas do sistema imune inato e adaptativo conduzem a resposta imune frente à infecção por *M. tuberculosis* através de citocinas pró-inflamatórias como IFN γ , TNF- α , IL-1 α , IL- β e GM-CSF que respondem de maneira protetiva à Tuberculose em modelos murinos (GRIS, 2013), em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF β , levam ao aumento da suscetibilidade à doença (DORHOI; KAUFMANN, 2014; ETNA *et al.*, 2014). Os níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias como IFN γ , TNF α , IL-22, IL-1 α , IL-12 e GM-CSF são significativamente aumentadas em indivíduos obesos em comparação aos eutróficos, enquanto citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5 e TGF β são diminuídos (ANURADHAA *et al.*, 2016). Esses dados fizeram com que a investigação acerca da comorbidade obesidade-tuberculose fossem intensificadas (GRIS, 2013; DORHOI; KAUFMANN, 2014; ETNA *et al.*, 2014; ANURADHAA *et al.*, 2016).

Em Lima, Peru, foram observados maiores níveis sanguíneos não estimulados de IFN- γ em pessoas com infecção latente da tuberculose (ILTB) do que pessoas sem ILTB, demonstrando ativação do sistema imune durante o curso da infecção por *M. tuberculosis* (HUAMAN *et al.*, 2018).

Um aspecto fundamental da patogênese da infecção por micobactérias que tem sido observado é quanto às alterações no metabolismo lipídico de células hospedeiras infectadas por patógenos intracelulares. Micobactérias patogênicas, como a *Mycobacterium tuberculosis*, sobrevivem e crescem a partir de lipídios provenientes das células hospedeiras e diferentes estudos sugerem que elas são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em infecções micobacterianas como na Tuberculose (ALMEIDA et al., 2009; RAJARAM et al., 2010; FATIMA et al., 2020).

1.4 CORPÚSCULO LIPÍDICO

Esta sessão foi subdividida em “características gerais e biogênese” e “corpúsculos lipídicos e seu papel em Infecções micobacterianas” para melhor compreensão do assunto.

1.4.1 Características Gerais e Biogênese

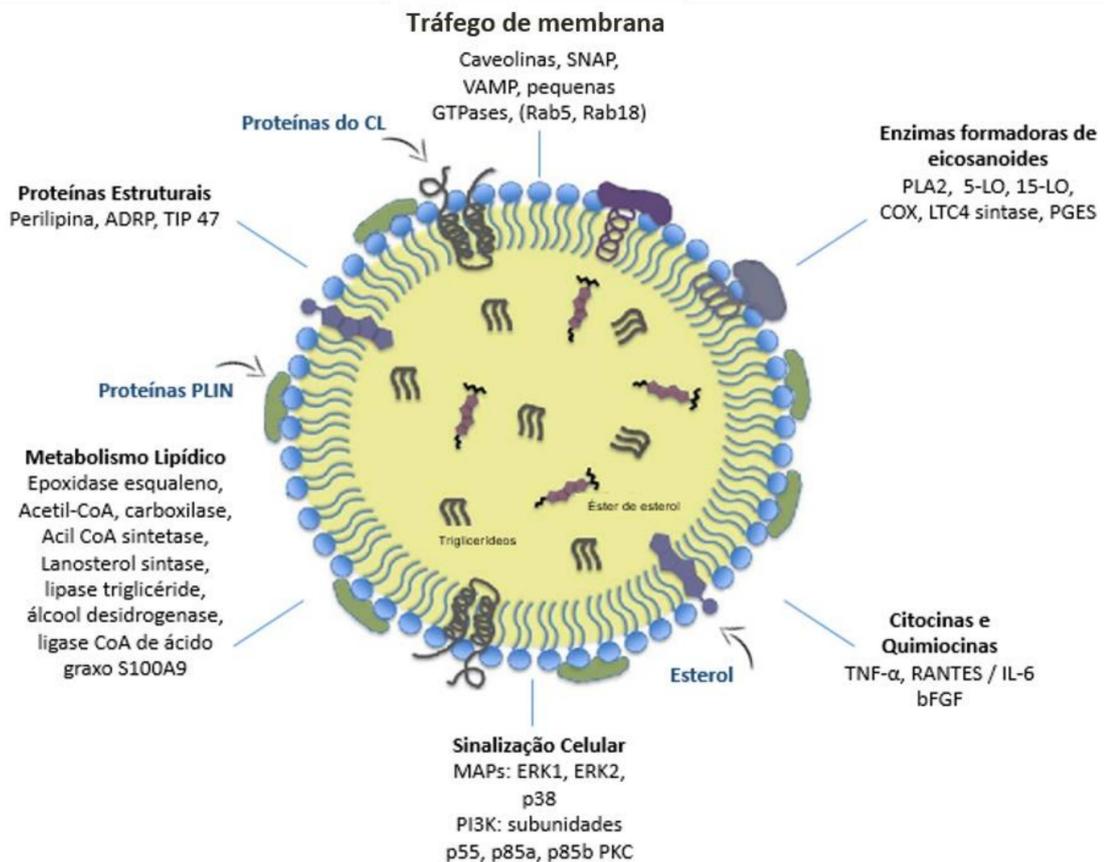
Os corpúsculos lipídicos (CL), ou gotículas lipídicas, são organelas esféricas presentes no citoplasma celular da maioria das células eucarióticas. São ricas em lipídios, com tamanho variável entre alguns nanômetros a centenas de micrômetros (como é o caso de adipócitos que apresentam corpúsculos lipídicos preenchendo todo o citoplasma da célula). Essas organelas são revestidas por uma monocamada fosfolipídica, além de apresentar conteúdo proteico associado e a composição lipídica inclui lipídios neutros, como triacilglicerol (TAG), ésteres de esteroide (SE) e colesterol (TAUCHI-SATO et al., 2002; D’AVILA et al., 2006; BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009; WALTHER; FARESE, 2012). Inicialmente considerou-se que células que apresentavam em seu conteúdo corpúsculos lipídicos eram exclusivamente associados ao armazenamento e transporte de lipídios neutros, entretanto, estudos recentes já demonstraram que essas organelas são de caráter dinâmico e altamente funcionais, servindo como sítios de sinalização em leucócitos, além de contribuir para a regulação do metabolismo lipídico, sinalização intracelular, tráfego de membrana além de participarem da síntese de mediadores inflamatórios (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007; BOZZA et al., 2009; FARESE; WALTHER, 2009; LINGALA; GHANY, 2016).

Devido ao seu caráter estrutural, a compreensão de como ocorrem as vias de transporte de proteínas e lipídios nos CL são desafiadoras, pois seu arranjo se diferencia dos mecanismos clássicos de transporte vesicular. Entretanto, sua distinção de outras organelas pode ser caracterizada por análises ultra-estruturais e por marcação através de sondas fluorescentes com afinidade por lipídios neutros (FARESE; WALTHER, 2009; MELO et al., 2011).

Uma ampla variedade de enzimas e proteínas podem ser compartimentalizadas nos CL. São exemplos proteínas quinases específicas e pequenas GTPases além de outras proteínas associadas a estrutura desta organela. Os CL compartimentalizam enzimas que estão envolvidas na biossíntese, transporte e catabolismo de lipídios, formadores de eicosanoides, caveolinas, proteínas quinases, como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3 quinase), proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP), proteína quinase C (PKC) e proteínas envolvidas no transporte vesicular, como VAT 1, SNAP e VAMP (Figura 13) (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009).

O conteúdo proteico dessas organelas foi descrito através de análise proteômica e sua classificação é feita em três grupos: proteínas estruturais (KIMMEL et al., 2010), que inclui perilipina 1 (PLIN1), PLIN2 (ADRP) e PLIN3; proteínas de tráfego de membrana, incluindo GTPases, proteínas da família Rab e chaperonas; enzimas de metabolismo de lipídios, como DGAT2, ATGL e HSL (BRASAEMLE et al., 2004; KORY et al., 2016). A composição proteica dos CL, assim como de lipídios, depende do tipo celular e seu estado fisiológico (MELO; DVORAK, 2012).

Figura 13 - Morfologia Básica do Corpúsculo Lipídico e Proteínas Associadas.



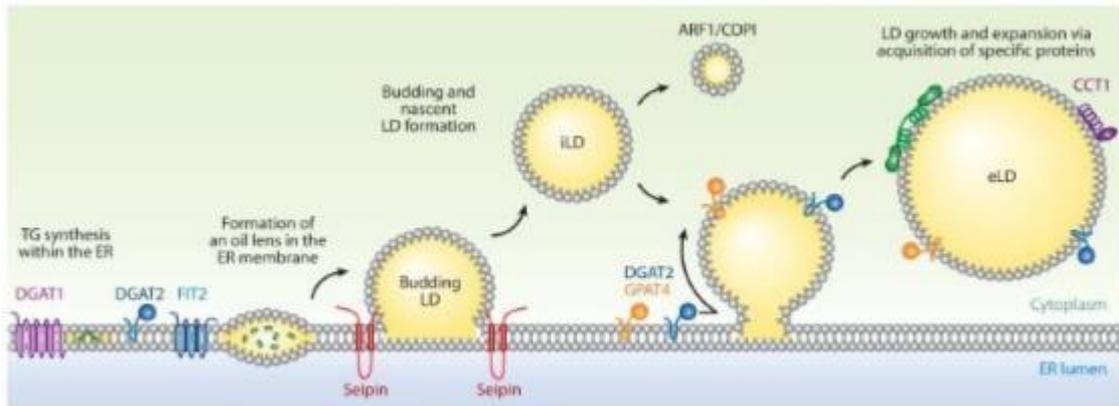
Fonte: Adaptado de Onal *et al.*, 2017.

A principal função das PLINs é coordenar a ação das lipases nos CLs, dependendo do estado energético celular, mas também cooperam na formação de sítios de contato de CL. Além disso, a monocamada dos CLs acomoda enzimas envolvidas na síntese de TAG, lipases neutras, metabolismo de fosfolípídios, autofagia e enzimas redox (BOSCH *et al.*, 2020).

A biogênese dos corpúsculos lipídicos já foi amplamente investigada e entre as teorias propostas a mais aceita atualmente é a de que este processo se inicia a partir do Retículo Endoplasmático (RE) (Figura 14), que apresenta um acúmulo de lipídios neutros entre a membrana dos folhetos citoplasmático e luminal do RE, gerando um brotamento dessa organela revestida pela monocamada fosfolipídica proveniente justamente do folheto citoplasmático (BOZZA *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2010; WALTHER *et al.*, 2017). O aumento do volume dos CL pode-se dar de duas maneiras:

tanto pela síntese localizada de lipídios (KUERSCHNER; MOESSINGER; THIELE, 2008), quanto pela fusão de corpúsculos (OLOFSSON et al., 2009).

Figura 14 - Biogênese do Corpúsculo Lipídico.



Fonte: Adaptado de Walther *et al.*, 2017.

O aumento no número de CL citoplasmáticos no interior de leucócitos vêm sendo cada vez mais associados às condições infecciosas, ateroscleróticas e inflamatórias de outras origens (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009). Em leucócitos inflamatórios há o armazenamento de ácido araquidônico (AA) em sua forma esterificada no interior de corpúsculos lipídicos, e sua importância se dá devido ao seu papel como precursor de mediadores lipídicos inflamatórios (D'AVILA et al., 2006). Em infecções por micobactérias, o AA e seus metabólitos lipídicos têm sido cada vez mais associados com a defesa do hospedeiro (ANES et al., 2003).

Um exemplo de mediador lipídico derivado de AA são os eicosanóides, capazes de desencadear respostas pró e anti-inflamatórias as quais incluem prostaglandinas, resolvinas, lipoxinas e leucotrienos. A formação de prostaglandinas pode-se dar por competição do substrato do AA pela ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LO), ou pela via de oposição 5-lipoxigenase (5-LO, alox5) ou lipoxinas e leucotrienos (SERHAN et al., 2008; GRIS, 2013; BUCKLEY et al., 2014). Em estudo realizado com infecção de camundongos por *M. bovis*, produtos do eixo 5-LO promovem o crescimento bacteriano e dificultam seu controle, enquanto a prostaglandina E2 (PGE2) garante resistência contra a infecção, portanto, deficiência de PGE2 gera aumento na carga micobacteriana (BAFICA et al., 2005; CHEN et al., 2008; KAUL et al., 2012).

A formação de corpúsculos lipídios ocorre em resposta ao excesso de lipídios e diversos tipos de estresse, como reações inflamatórias. Já foi observado tanto em contexto clínico, quanto experimental de doenças inflamatórias, o aumento do acúmulo citoplasmático de CLs, em diversos tipos celulares, em leucócitos de pacientes com artrite (BOZZA et al., 1996), no lavado broncoalveolar de pacientes com síndrome respiratória aguda grave (TRIGGIANI et al., 1995), em leucócitos peritoneais de pacientes com sepse (PACHECO et al., 2007), em macrófagos em lesões ateroscleróticas (PAUL et al., 2008; SCHMITZ; M. GRANDL, 2008), em eosinófilos durante resposta alérgica (VIEIRA-DE-ABREU et al., 2011), e em granulomas no pulmão e pele de pacientes com Tuberculose e Hanseníase (D'AVILA et al., 2006; LUGO-VILLARINO et al., 2012; MATTOS et al., 2011) e infecções por protozoários (TOLEDO et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2018; VALLOCHI et al., 2018).

Assim, pode-se compreender a importância e influência dessas organelas durante processos infecciosos causado por patógenos intracelulares, uma vez que CLs representam sítios de formação de mediadores lipídicos e inflamatórios.

Além disso, fatores de transcrição estão envolvidos na formação dessas organelas (ALMEIDA et al., 2009). Os PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) são fatores de transcrição da família dos receptores nucleares, que incluem 3 isoformas: PPAR- α (também chamado de NR1C1), PPAR- β/δ (NR1C2), and PPAR- γ (NR1C3) (FANALE et al., 2017). Cada isoforma, apesar de apresentarem diversas similaridades, possuem propriedades bioquímicas individuais, variada distribuição nos tecidos e indução de diferentes respostas celulares, o que confere funções distintas para cada uma delas (FANALE et al., 2017). Os PPARs são responsáveis pela regulação direta da transcrição de genes que estão relacionados ao metabolismo de glicose e lipídios (GENOLET et al., 2005; MANDARD et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009), adipogênese, diferenciação celular (NADRA et al., 2006; TAN et al., 2007), além do estoque intracelular e oxidação de ácidos graxos e inflamação (ALMEIDA et al., 2009; BENSINGER; TONTONNOZ, 2008). A formação de heterodímeros com o receptor retinoide X (RXR) leva à ativação de genes específicos quando se ligam à elementos responsivos de genes alvo (GEARING et al., 1993; KELLER et al., 1993; CHAWLA et al., 2001).

Além de ser essencial na diferenciação de adipócitos, o PPAR γ também atua na resposta inflamatória, sendo observada sua expressão em diversas células do sistema imunológico, como monócitos/macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e

B e plaquetas (HEMING et al., 2018). Estudos anteriores demonstraram que o PPAR é capaz de regular negativamente a expressão de genes inflamatórios, incluindo genes de citocinas pró-inflamatórias (JIANG et al., 1998) e da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), através da repressão transcricional de STAT6, AP-1 e NFkB (GLASS; SAIJO, 2010; ALMEIDA et al., 2012), além de inibir a ativação macrófaga (RICOTE et al., 1998).

1.4.2 Corpúsculos Lipídicos e seu papel em Infecções micobacterianas

A formação de corpúsculos lipídicos durante o processo inflamatório é um evento altamente controlado e dependente de vias sinalização e estímulos. Os mecanismos e vias de ativação responsáveis pela formação de CLs induzidas por micobactérias envolvem o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos bacterianos (PAMPs) por *toll like receptors* (TLRs) (D'AVILA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2009; CHEN et al., 2008; MATTOS et al., 2010). Além disso, o fator transcricional Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos Gamma (PPAR γ) possui papel fundamental na regulação do metabolismo lipídico, e na resposta imunológica frente a infecções micobacterianas (ALMEIDA et al., 2009).

Nosso grupo demonstrou que os CLs formados em resposta ao bacilo Calmette-Guérin (BCG) e *Mycobacterium leprae* constituem sítios para síntese de eicosanoides, acarretando no aumento da produção de PGE2 por macrófagos infectados (BOZZA et al., 1998, 2011; BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009). A PGE2 é um potente modulador imune que regula negativamente as respostas Th1 e a atividade bactericida em organismos intracelulares (D'AVILA et al., 2006). As vias TLR2 e TLR6 são ativadas preferencialmente durante a biogênese do CL desencadeada pela infecção por *M. bovis* BCG e *M. leprae* respectivamente (BOZZA et al., 2009; D'AVILA et al., 2006; D'AVILA et al., 2008; MATTOS et al., 2010).

Em estudos do nosso grupo, foi demonstrado que o aspecto espumoso de células enriquecidas com CLs também é observado em infecções por *M. leprae* como estratégia intracelular micobacteriana para adquirir lipídios e modular a resposta imune favorecendo a sua sobrevivência (DE MATTOS et al., 2012). Em contrapartida, a ativação de macrófagos *in vitro* com *M. smegmatis*, ou Pam3CSK4, ambos potentes ligantes de TLR2, não foi capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos, assim, sugere-se que o TLR2 sozinho não é suficiente sendo necessária

associação de co-receptores para o reconhecimento bacteriano e estes podem ser responsáveis pelo recrutamento de sinalização moléculas importantes para expressão de PPAR γ e formação de CL (ALMEIDA et al., 2014).

O aumento da expressão e ativação de PPAR γ , através de vias independentes de NF- κ B se dá por associação entre CD36-TLR2, juntamente à CD11b e CD14, compartimentalizados em “*lipid-rafts*”, o que gera, por consequência, aumento do acúmulo de lipídios em macrófagos e modulação da resposta imune (ALMEIDA et al., 2009, 2014). A expressão de PPAR γ e acumulação de lipídios de macrófagos após infecção por *M. bovis* BCG deve-se à essencial sinalização de TLR2 (ALMEIDA et al., 2009). Além disso, distintas vias de sinalização do TLR2 estão envolvidas na expressão de citocinas e na regulação do metabolismo lipídico (ALMEIDA et al., 2014). Durante as infecções por *Mycobacterium bovis* BCG e por *Trypanosoma cruzi*, a formação de corpúsculos lipídicos mostra-se dependente do receptor semelhante ao receptor TLR2, mas não TLR4 (ALMEIDA et al., 2009; D’AVILA et al., 2006, 2011). Estudos realizados pelo nosso e outros grupos demonstraram que infecção micobacteriana aumenta significativamente a expressão de PPAR- γ em macrófagos humanos e murinos (ALMEIDA et al., 2009; RAJARAM et al., 2010). Durante a infecção, PPAR- γ é capaz de regular positivamente a expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e, conseqüentemente, aumentar a síntese de prostaglandina E2, um mediador inflamatório que inibe a resposta Th1 e atividades microbidas (D’AVILA et al., 2006; MORTENSEN et al., 2019).

As formas dormentes das bactérias de *M. tuberculosis* geralmente não respondem ao tratamento com antibióticos, e sua localização ou mecanismos de escape dos medicamentos e detecção ainda são pouco compreendidos. No entanto, estudos já demonstraram que as células-tronco mesenquimais (CTM) representam um nicho importante para a TB latente (DAS et al., 2008; RAGHUVANSHI et al., 2010; KHAN et al., 2017). Fátima e colaboradores (2020) demonstraram que o *M. tuberculosis* promove a rápida síntese lipídica nas CTMs, levando à formação de corpúsculos lipídicos que protegem as bactérias internalizadas. Além disso, a inibição da síntese lipídica reduz drasticamente a expressão de genes relacionados à dormência (Rv3131, hspX, Rv0571c, devR) enquanto regula positivamente os genes relacionados à replicação (FtsQ e parA), o que sensibiliza os organismos à morte mediada por antibióticos (FATIMA et al., 2020).

Todos esses dados reforçaram o papel das CLs favorecendo a sobrevivência e persistência de micobactérias na célula hospedeira e suportam um papel crítico para os corpúsculos lipídicos na patogênese micobacteriana.

A fim de ampliar os estudos acerca da associação entre a obesidade e a microbiota intestinal durante a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG e suas possíveis interferências na modulação e ativação do sistema imunológico, estabelecemos um estudo multidisciplinar realizado com auxílio de ferramentas da biologia celular e molecular, bioquímicas, imunológicas e microbiológicas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos foram caracterizados como “Objetivo Geral” e “Objetivos Específicos” como descrito abaixo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as associações entre Obesidade e Microbiota Intestinal na Tuberculose Experimental no que se refere à formação de corpúsculos lipídicos e aspectos da resposta inflamatória.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(I) Analisar se a indução da obesidade pelo modelo de dieta hiperlipídica e o seu impacto no ganho ou perda de peso após infecção por *Mycobacterium bovis* BCG;

(II) Analisar a ativação e migração de leucócitos para o sítio inflamatório em camundongos eutróficos e obesos durante a infecção micobacteriana;

(III) Analisar se a biogênese de corpúsculos lipídicos em leucócitos pleurais é afetado pela obesidade em camundongos infectados ou não por *Mycobacterium bovis* BCG;

(IV) Avaliar a síntese de citocinas (TNF- α , KC e IL-10) no lavado pleural de camundongos obesos e eutróficos durante a infecção micobacteriana;

(V) Analisar infiltração inflamatória intestinal nos camundongos eutróficos e obesos infectados por *Mycobacterium bovis* BCG;

(VI) Avaliar a estrutura microbiana intestinal dos grupos Eutrófico e Obeso infectados ou não por *Mycobacterium bovis* BCG.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Cada etapa da pesquisa está descrita separadamente a seguir.

3.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O modelo animal escolhido para a realização do presente trabalho foi o Camundongo da linhagem C57BL/6 machos, fornecidos pelo Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Os animais foram recebidos com idade entre 4 e 6 semanas e mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Laboratório de Biologia Celular (LBC), com temperatura entre 22 a 24°C, com ciclos de 12 h luz/escuro e livre oferta de água e comida.

Os 48 animais de cada experimento foram divididos entre grupos Eutrófico e Obeso, infectados ou não. Foram realizados 4 experimentos, totalizando 192 animais (Tabela 1):

Tabela 1 - Divisão dos animais em grupos por experimento.

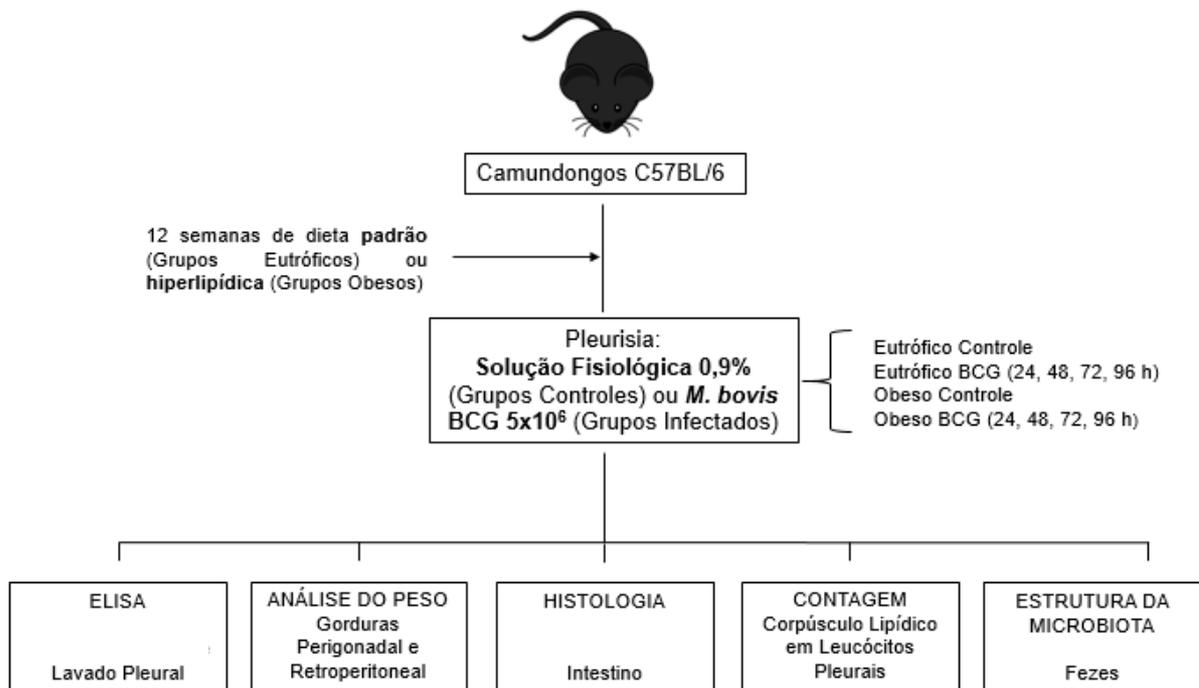
<i>Grupos</i>	<i>Total de animais</i>
Eutrófico Controle (EU/CT)	12 animais
Eutrófico BCG (EU/BCG)	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas (EU/BCG 24 h): 3 animais • 48 horas (EU/BCG 48 h): 3 animais • 72 horas (EU/BCG 72 h): 3 animais • 96 horas (EU/BCG 96 h): 3 animais
Obeso Controle (OB/CT)	12 animais
Obeso BCG (OB/BCG)	<ul style="list-style-type: none"> • 24 horas (OB/BCG 24 h): 3 animais • 48 horas (OB/BCG 48 h): 3 animais • 72 horas (OB/BCG 72 h): 3 animais • 96 horas (OB/BCG 96 h): 3 animais

Fonte: Elaborado pela autora.

Os materiais biológicos extraídos dos animais para posteriores análises foram o lavado pleural, o plasma sanguíneo, as gorduras retroperitoneal e perigonadal, a porção final do intestino grosso e as fezes (Figura 15).

Todos os procedimentos realizados nos experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética/UFJF com número de protocolo 028/2016.

Figura 15 - Desenho Experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE

Os camundongos da linhagem C57BL/6 pertencentes ao grupo Obeso foram submetidos à uma dieta por ração hiperlipídica (Tabela 2) (KENNEDY et al., 2008).

A confirmação da obesidade foi feita através do cálculo do Índice de Lee (peso corporal (g) ^{1/3}/ comprimento naso-anal (cm) x 1000), e, também, através do peso das gorduras retro-peritoneal e perigonadal (ANDREAZZI et al., 2009).

Tabela 2 - Composição da ração hiperlipídica.

Dieta Hiperlipídica 35,2%	
COMPONENTES	(g)
Amido de Milho	115,5
Amido de Milho Dextrinizado	132
Caseína	200
Sacarose	100
Banha de Porco	312
Celulose Microfina	50
Mistura de Vitaminas	10
Mistura de Minerais	35
Óleo de Soja	40
L-cistina	3
Bitartarato de Colina	2,5
TOTAL:	1000g

Fonte: Adaptado de Kennedy *et al.*, 2008.

3.3 INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis*, (BCG)

A infecção dos animais foi realizada através da utilização de *Mycobacterium bovis*, BCG da cepa Moreau obtidas na forma de vacina liofilizada em ampolas de 40 mg contendo aproximadamente $2,0 \times 10^8$ bacilos. Os bacilos foram diluídos em PBS estéril e ajustados na concentração de $5,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) / ml. Anteriormente à infecção, os bacilos foram sonicados durante 5 minutos e homogeneizados 10 vezes em seringa descartável 32G.

3.4 PLEURISIA INDUZIDA POR BCG

Foi realizada infecção intratorácica (IT) dos animais com BCG (5×10^6 bacilo/cavidade) diluídos em 100 μ L salina estéril, e os animais controles receberam volume igual a 100 μ L de salina estéril. Após a infecção por BCG os animais foram mantidos por 24, 48, 72 ou 96 horas e após o tempo de infecção os animais foram eutanasiados pelo método de inalação de CO², seguido por ruptura do diafragma.

Os animais infectados continuaram com dieta, ingestão de água e comportamento idênticos aos animais controle que não receberam a injeção por BCG. Em seguida, foi realizada lavagem da cavidade pleural com 1 mL de PBS estéril para obtenção da suspensão celular.

3.5 AQUISIÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Posteriormente à eutanásia, as cavidades peritoneais dos animais foram abertas e seus tecidos adiposos retro-peritoneal e perigonadal foram removidos com auxílio de pinça e tesoura e pesados para predição da obesidade. Além disso, a porção final do intestino foi coletada, fixada em paraformaldeído (PFA) 4% e mantida em geladeira, para posterior análise histológica.

3.6 CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS

Após realizada a coleta do lavado pleural foi retirada uma alíquota de 10 µl da suspensão celular e diluída em 390 µL de TURK (cristal violeta a 0,0005% em solução de Ácido Acético a 2% em PBS). Os leucócitos pleurais da suspensão foram contados em câmara de Neubauer em microscópio de campo claro.

3.7 COLORAÇÃO E CONTAGEM DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Foram retiradas alíquotas do lavado pleural e citocentrifugadas para a confecção das lâminas que foram posteriormente fixadas em formalina 3,7%. Essas lâminas foram coradas com Oil-Red-O ou Bodipy.

A solução estoque de Oil-Red-O (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,3% (0,3 g de Oil Red O/100 mL de isopropanol (ácido isopropílico) (Sigma Aldrich), filtrada e acondicionada em temperatura ambiente. No dia da coloração, a solução de uso foi preparada diluindo-se a solução estoque em água destilada na proporção 3:2. Concluída a diluição, a solução foi novamente filtrada e utilizada para a coloração de corpúsculos lipídicos. A solução de formalina 3,7% foi retirada e os poços foram lavados com água destilada. Em seguida, foram adicionados 300 µl da solução de uso de Oil-Red-O, e incubando por 5 minutos no escuro. Decorrido o tempo, as células foram lavadas em sequência 2 x com água destilada, isopropanol 30% e PBS 1%. As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® *mounting medium containing* DAPI, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação do núcleo das células. Os corpúsculos lipídicos foram contados em 50 células consecutivas após análise em microscópio de fluorescência BX-51 acoplado com câmera digital XC-50, sob objetiva

de 100 ou 40 x (Olympus, Tokyo, Japan) ou a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100, com auxílio do programa CellSens Dimension.

3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E ADIPOCINAS

Para dosagem das concentrações das quimiocinas, KC (homóloga a IL-8 humana) e citocinas IL-10 e TNF- α no lavado pleural foi realizado o teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) por meio da utilização de kits Duo set (R&D Systems) e os ensaios foram realizados seguindo as recomendações do fabricante.

A leitura da densidade ótica foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm utilizando o programa Softmax Pro. A quantificação das citocinas foi calculada a partir das curvas padrão, obtidas da diluição seriada dos respectivos recombinantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

3.9 HISTOLOGIA

O processador automático Lupetec, modelo PT 05, foi utilizado para os procedimentos histológicos. Inicialmente, os tecidos foram colocados em Álcool 70 % por 1 hora, Álcool 95% (por 1 hora), Álcool Absoluto I, II, III, IV e V (por 1 hora em cada um), Xilol I e II (por 90 minutos cada um), e finalmente, Parafina a 60°C I e II (por 90 minutos cada um). A inclusão dos tecidos foi realizada em posição transversal em moldes previamente preenchidos com parafina líquida e com sua superfície a ser seccionada para baixo.

Os blocos sofreram cortes de 4 μ m de espessura no micrótomo Lupetec (modelo rotativo). A fim de que os cortes se alongassem na superfície da água, as fitas foram deixadas em banho-maria (em torno de 40°C). Com o auxílio de uma lâmina previamente limpa, os cortes foram coletados e colocados em suporte próprio para escorrimento da água. Como forma de complementação da adesão do corte à lâmina, estas foram colocadas em estufa aquecida à 60°C *overnight*.

Foi realizada coloração de hematoxilina-eosina (HE) no tratamento dos cortes. Primeiramente, foi feita desparafinização em Xilol I, II e III por 5 min em cada imersão. Para remoção do Xilol, utilizou-se Álcool I, II e III (todos absolutos) também por 5 min

cada imersão. Para a etapa de coloração foi utilizada a Hematoxilina de Mayer (Hematoxilina 1g, água destilada 1000mL, iodato de sódio 0,2g, alúmen de amônia ou potássio 50g, ácido cítrico 1g e hidrato de cloral 50g) por 1 minuto, em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente (3 minutos), e, finalmente, coradas com Eosina-Floxina por 1 minuto e imediatamente lavados em água corrente durante 3 min. Ao final deste processo, as lâminas foram submetidas a lavagens curtas de 10 segundos em Álcool IV, V e VI (todos absolutos).

As lâminas foram mantidas em Xilol para realização da montagem. O meio de montagem utilizado nas lâminas foi o Verniz Vitral Incolor.

3.10 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL

Para realização da análise da microbiota intestinal três etapas foram necessárias: extração de DNA, realização da técnica de rep-PCR e análises *fingerprints*.

3.10.1 Extração de DNA

A partir do primeiro dia de infecção amostras fecais foram coletadas diariamente para caracterizar a estrutura da microbiota intestinal por rep-PCR. Para isso, foi realizado pool das amostras com no mínimo 3 animais. As alíquotas foram congeladas a - 80°C até a realização da extração de DNA. A extração do DNA foi realizada seguindo protocolo de utilização de fenol-clorofórmio (STEVENSON; WEIMER, 2007).

3.10.2 Técnica de rep-PCR

O DNA extraído das amostras foi utilizado, então, para a realização de análises por rep-PCR. Um único oligoiniciador (GTG)₅ (5' - GTGGTGGTGGTGGTG-3') foi utilizado para a realização das reações.

O volume das reações de PCR foi de 25 µL, contendo 1x de Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0,4 µM do primer, aproximadamente 50 ng/µL de DNA, 20 pMol de oligoiniciador e o volume completado com água de PCR ultrapura (Promega Corporation).

A amplificação foi realizada em termociclador automatizado (Biometra T1 Thermal Cycler, Gttingen, Alemanha) programado nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram separados em gel de agarose 2% usando tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), por aproximadamente 1 hora e 40 minutos a 100 volts. Foi utilizado o padrão de peso molecular 100 bp ou 1 kb DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA).

Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido). A imagem do gel foi visualizada no transluminador ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido) e salvas no formato TIF.

3.10.3 Análises *fingerprints*

As análises de *fingerprints* foram realizadas utilizando o programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). O dendrograma foi construído com base no coeficiente Jaccard de similaridade e no método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) para análise dos grupamentos.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) seguido pelo Teste t de Student e/ou Anova com pós teste Tukey com significância de $p < 0.05$. Todos os gráficos e análises foram obtidos através do programa GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

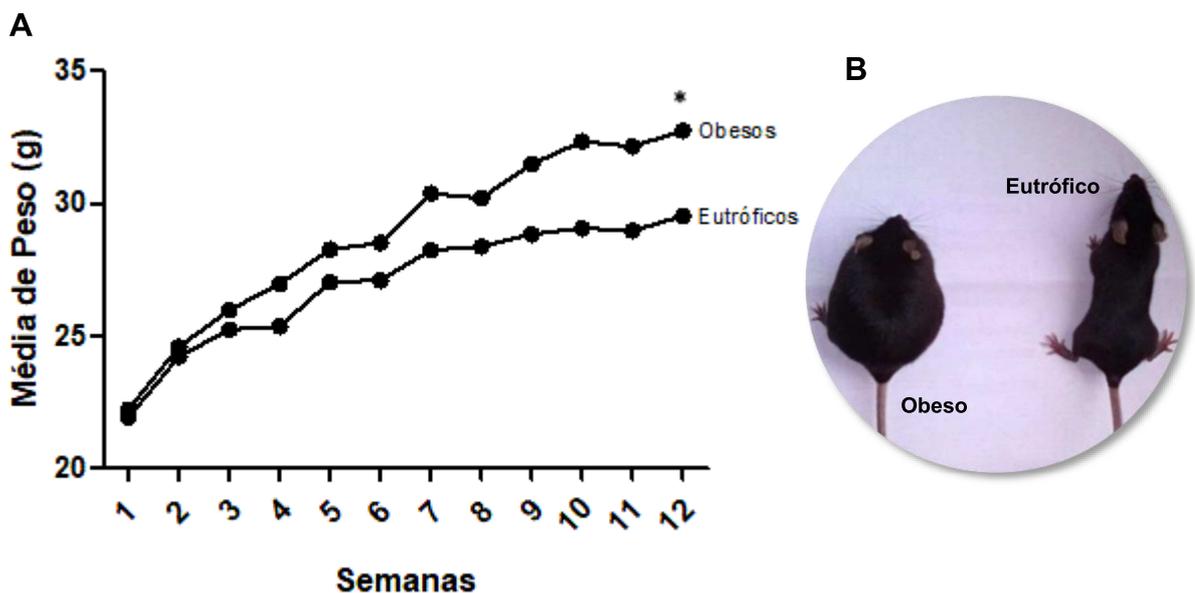
Os dados obtidos nesta pesquisa estão descritos a seguir.

4.1 A DIETA HIPERLIPÍDICA FOI CAPAZ DE INDUZIR A OBESIDADE

No presente trabalho foi utilizada a dieta hiperlipídica, conforme ilustrada na Tabela 2, devido ao seu caráter, já bem estabelecido na literatura, de indução no ganho de peso e aumento da inflamação (KENNEDY et al., 2008).

Todos os animais foram pesados uma vez por semana no período da manhã, durante doze semanas e a média de peso foi registrada (Figura 16).

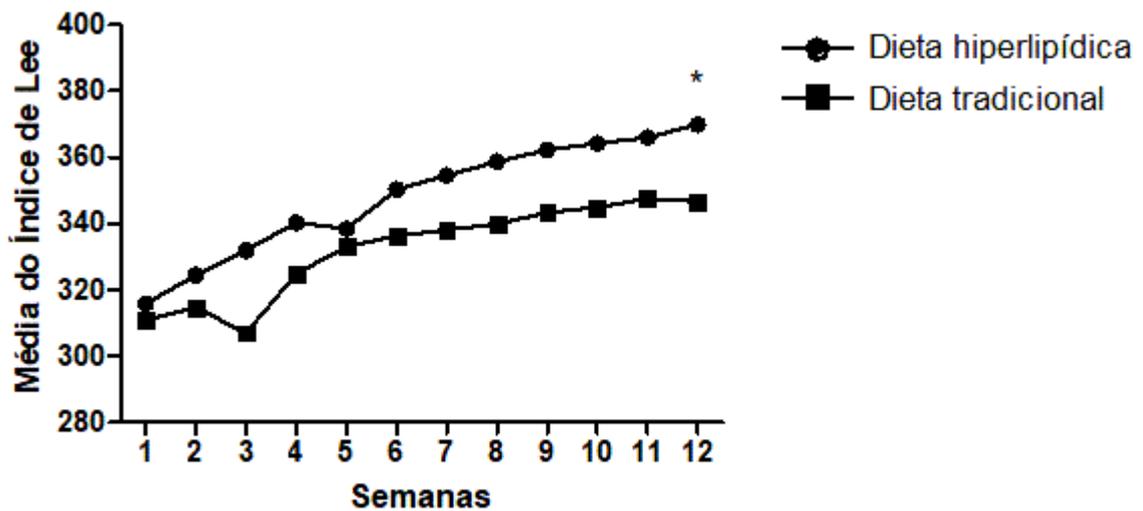
Figura 16 - **Peso médio dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.**



Os animais foram pesados uma vez por semana até completarem as 12 semanas do protocolo de indução de obesidade. (A) Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). (B) Imagem de um camundongo do grupo obeso à esquerda e camundongo do grupo eutrófico à direita. Fonte: Elaborado pela autora.

Após submetidos à dieta hiperlipídica pelo período de 12 semanas, foi possível concluir que estes animais apresentaram um quadro de obesidade quando comparados aos animais que se alimentaram de dieta tradicional, através do cálculo do Índice de Lee (Figura 17).

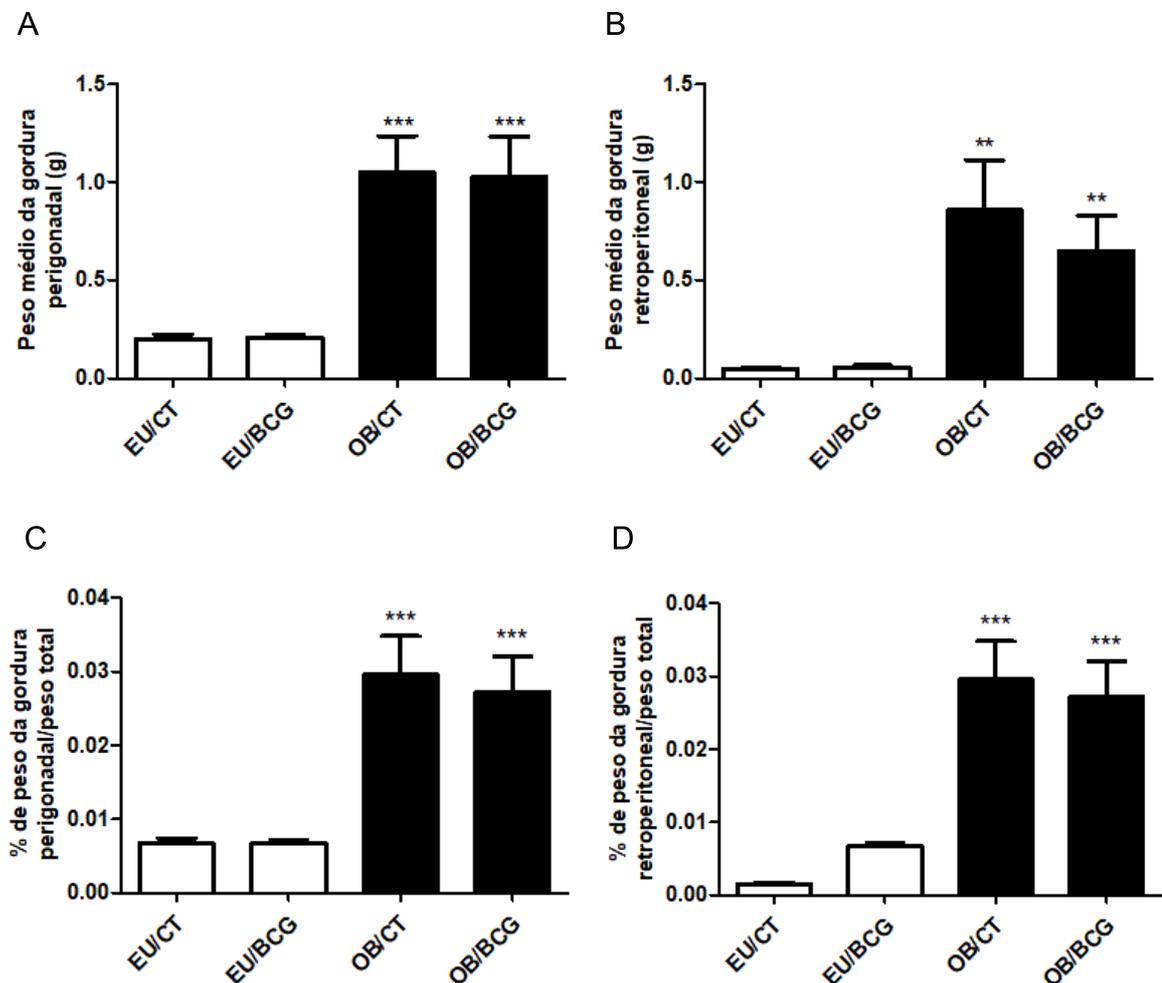
Figura 17 - Índice de Lee dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.



Média do índice de Lee, calculada com base no peso final de cada camundongo. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). Fonte: Elaborado pela autora.

Além disso, a fim de gerar confirmação de mais um parâmetro da indução da obesidade pela dieta hiperlipídica, foram pesadas as gorduras retroperitoneal e perigonadal após eutanásia dos animais (Figura 18A e B). Foi analisada a razão entre essas gorduras e o peso final de cada animal (Figura 18C e D), sendo possível, assim, observar diferença significativa no peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal dos camundongos submetidos a dieta hiperlipídica, grupo obeso, em comparação aos camundongos que receberam a dieta convencional (eutróficos).

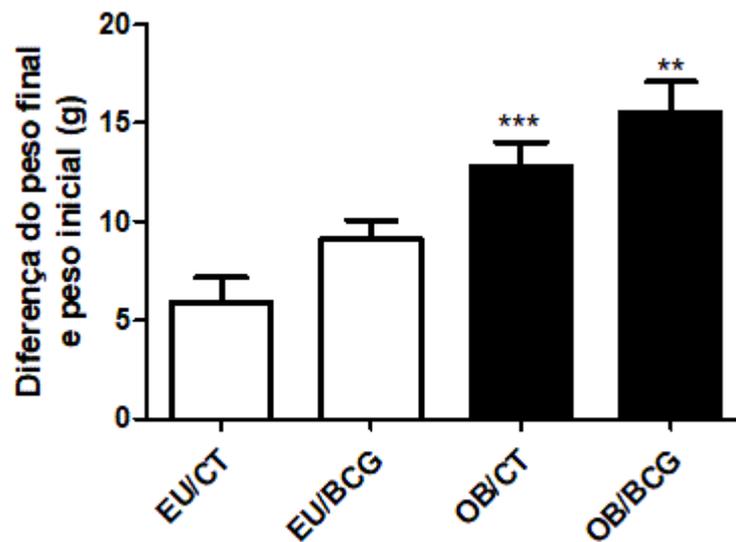
Figura 18 - Comparação entre as gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos eutróficos e obesos.



(A) Peso médio da gordura perigonadal, (B) Peso médio da gordura retroperitoneal, (C) Porcentagem relativa entre o peso da gordura perigonadal e o peso total do animal, e (D) Porcentagem relativa entre o peso da gordura retroperitoneal e o peso total do animal. Gráficos obtidos através do programa GraphPad Prism 5. A diferença significativa entre os indivíduos obesos e eutróficos foi indicada por * ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Foi realizado também o cálculo da diferença do peso dos camundongos após 12 semanas de dieta para cada grupo e observa-se diferença significativa entre obesos e eutróficos (Figura 19).

Figura 19 - Diferença de peso final e peso inicial dos animais tratados com dieta hiperlipídica ou padrão.

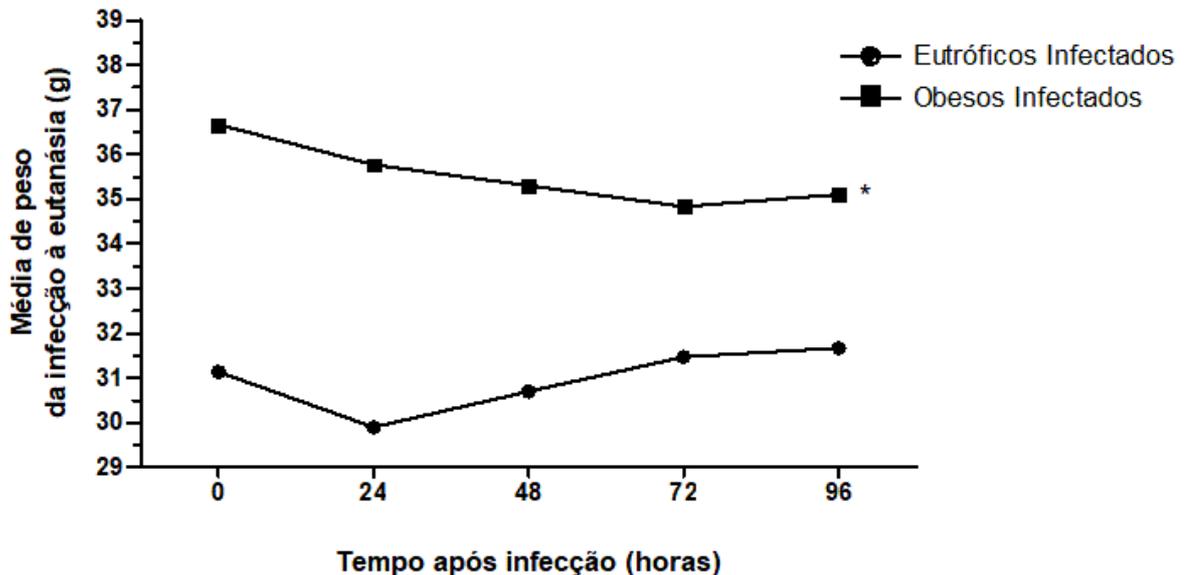


Os animais foram pesados do dia 0 (início da dieta) até ao final das 12 semanas (pós dieta) protocolo de indução de obesidade. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG INDUZIU A PERDA DE PESO EM CAMUNDONGOS OBESOS APÓS 96 HORAS

Para avaliar o ganho ou perda de peso dos camundongos dos grupos eutróficos e obesos infectados, os animais foram pesados no tempo 0, e sucessivamente nos tempos de 24, 48, 72 ou 96 h. Foi possível observar que os animais obesos infectados tiveram uma perda significativa no peso corporal, ao final das 96 horas de infecção por *M. bovis* BCG (Figura 20).

Figura 20 - **Peso corporal dos camundongos eutróficos e obesos após infecção por *Mycobacterium bovis* BCG.**

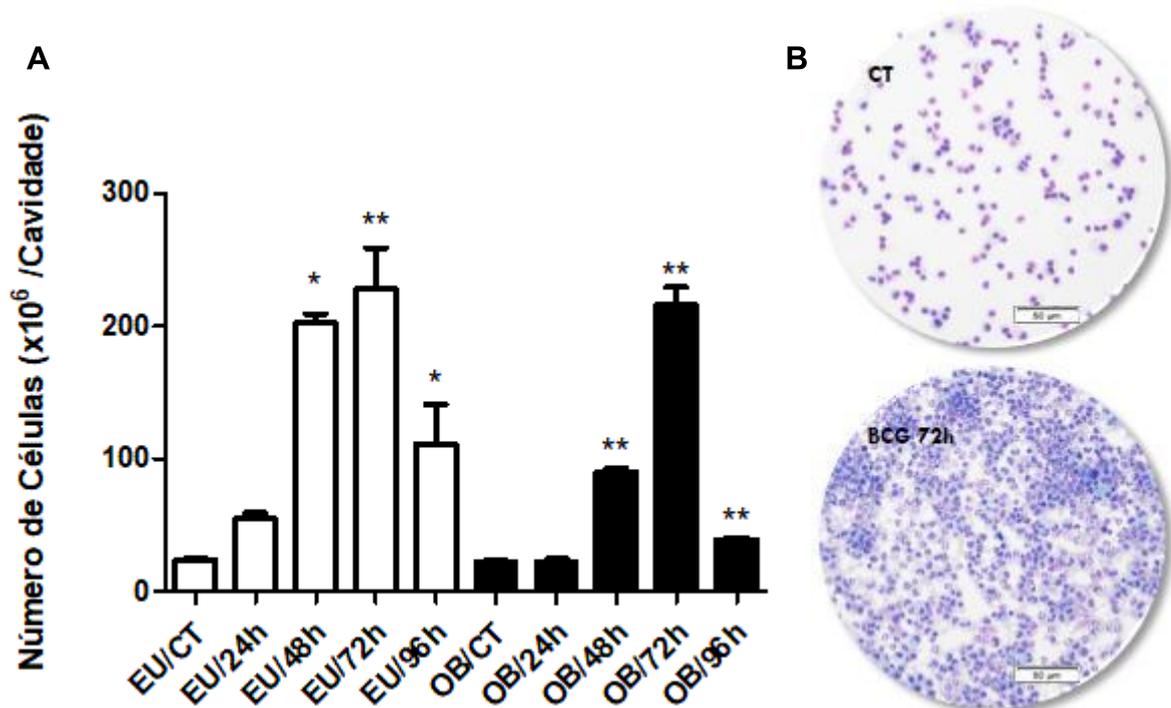


Os animais foram pesados no dia da infecção e após 24, 48, 72 e 96 horas. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 A PLEURISIA COM *Mycobacterium bovis* BCG INDUZIU O AUMENTO DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

A infecção por *M. bovis* BCG pôde ser confirmada através de uma análise de migração total de células na cavidade pleural dos animais. Observa-se maior influxo leucocitário em ambos os grupos infectados e aumento significativo quando comparados aos seus respectivos grupos Controles (Figura 21). Desta forma, é possível afirmar que a infecção dos animais eutróficos e obesos foi efetivada.

Figura 21 - **Contagem da migração celular em camundongos eutróficos e obesos durante a infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG em 24, 48, 72 e 96 h.**



(A) Diferença entre os grupos Eutróficos e Obesos BCG 48h, 72 h e 96 h em relação aos seus respectivos grupos Controle e ao grupo 24h foi indicada por * ($p < 0,005$). Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). (B) Imagens obtidas por microscopia de luz de animal eutrófico controle (CT) e infectado por *Mycobacterium bovis* BCG após 72 h (BCG 72 h). Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG AUMENTOU A BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM CAMUNDONGOS EUTRÓFICOS E OBESOS APÓS 24 H, 48 H, 72 H E 96 H

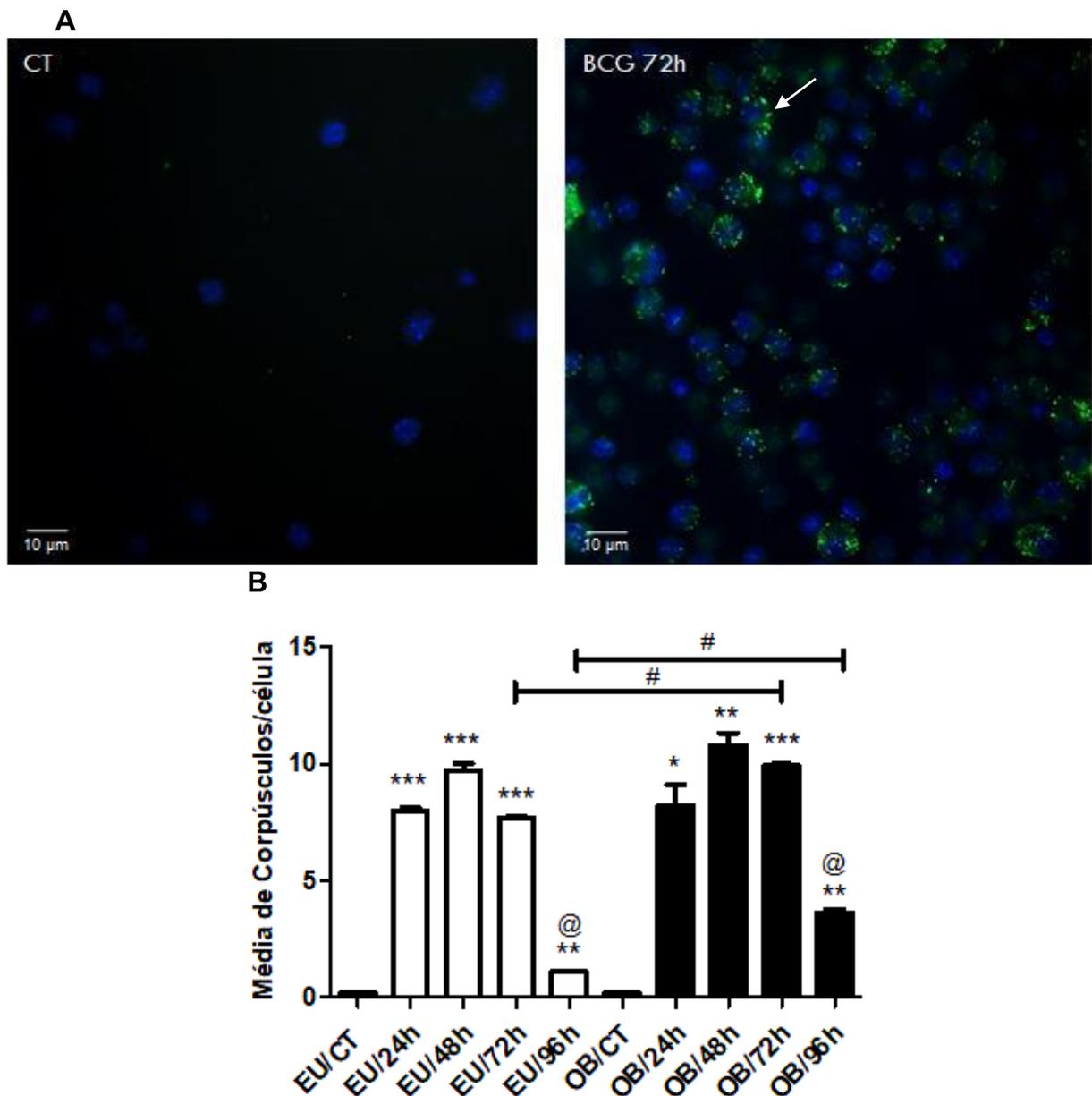
Vários estudos têm demonstrado que os corpúsculos lipídicos estão relacionados ao processo inflamatório em que a partir de estímulos micobacterianos, há um aumento no número e tamanho dessas organelas em leucócitos (ALMEIDA et al., 2009, 2012, 2014; RAJARAM et al., 2010; FATIMA et al., 2020).

A formação de corpúsculos lipídicos foi analisada a partir da confecção de lâminas feitas por citospin de leucócitos provenientes do lavado pleural. As colorações utilizadas para visualização dessas organelas foram Oil-Red-O e Bodipy, e as contra-colorações dos núcleos foram observadas com DAPI.

Foi possível observar que a infecção por *M. bovis* BCG induziu um aumento significativo na formação de corpúsculos lipídicos tanto em animais eutróficos quanto

em obesos (Figura 22A e B). Além disso, também podemos observar que nos tempos de 72 e 96 h os animais obesos apresentaram aumento significativo no número de corpúsculos lipídicos quando comparados aos camundongos eutróficos considerando os mesmos tempos de infecção (Figura 22B).

Figura 22 - Formação de Corpúsculos Lipídicos em leucócitos do lavado pleural após 24, 48, 72 ou 96 h de infecção por *Mycobacterium bovis* BCG.



(A) Figuras de leucócitos pleurais de animais eutróficos controle e infectado. Os núcleos foram corados com DAPI e a seta indica a formação de Corpúsculos Lipídicos corados com Bodipy. (B) Gráfico da média de corpúsculos lipídicos por célula. Cada barra representa a média, \pm erro padrão de no mínimo 3 animais por grupo. A diferença entre os grupos infectados e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). A diferença entre os grupos infectados no tempo de 96 h e seus respectivos outros tempos de infecção foi indicada por @ ($p < 0,005$). A

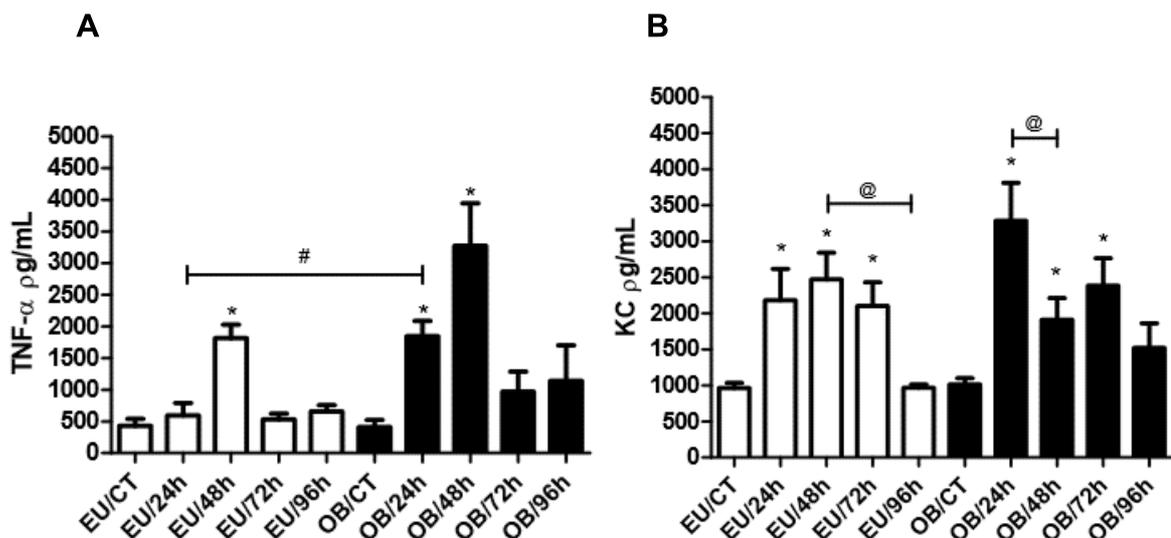
diferença entre os grupos Eutrófico BCG 72 e 96 h e Obeso BCG 72 e 96 h foi indicada por # ($p < 0,005$). Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG INDUZIU AUMENTO NA SÍNTESE DAS CITOCINAS TNF- α E KC EM LAVADOS PLEURAIIS DE CAMUNDONGOS EUTRÓFICOS E OBESOS

Dados da literatura já demonstraram que, tanto em murinos quanto em humanos, o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , desempenha um papel protetor no curso de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (LIN et al., 2007; COOPER; MAYER-BARBER; SHER, 2011; GRIS, 2013; O'GARRA et al., 2013).

Como esperado, nossos dados apresentam um aumento significativo nos níveis de TNF- α e KC frente a infecção por *M. bovis* BCG (Figura 23A e B). E, apesar de não apresentar diferenças significativas, o perfil de aumento dessas citocinas em animais obesos apresenta-se mais expressivo quando comparado aos animais eutróficos, corroborando, os estudos realizados por Anuradhaa e colaboradores em 2016.

Figura 23 - Estudo da síntese de TNF- α e KC produzidas por leucócitos pleurais infectados ou não por *Mycobacterium bovis* BCG após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção.



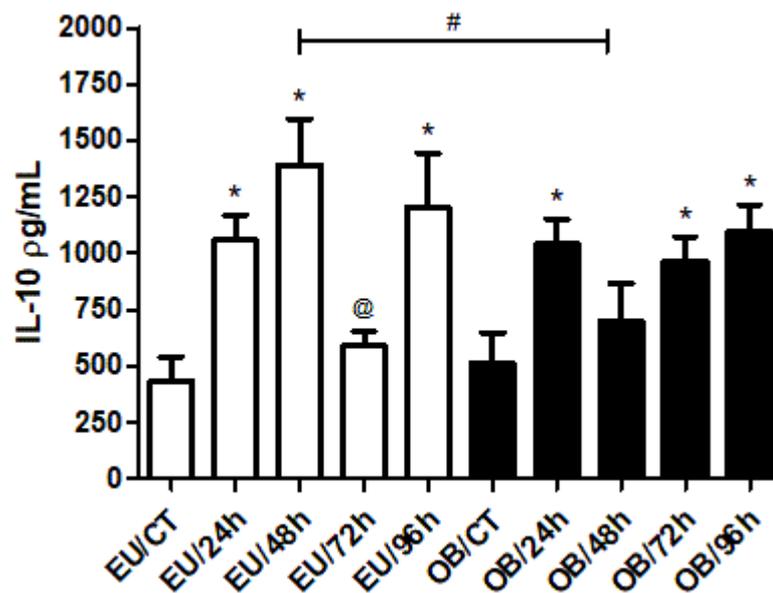
Análise da síntese (A) TNF- α e (B) KC provenientes de lavados pleurais de camundongos eutróficos ou obesos. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. Cada barra representa a média, \pm erro padrão de no mínimo 5 animais por grupo. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). A diferença entre os grupos Eutrófico e Obeso foi expressa por # ($p < 0,005$). A diferença entre os tempos de infecção de um mesmo grupo expressa por @ ($p < 0,005$). Fonte: Elaborado pela autora.

4.6 A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG LEVOU À DIMINUIÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-10 EM LAVADOS PLEURAIS DE CAMUNDONGOS OBESOS APÓS 48 HORAS

Já foi demonstrado que as citocinas anti-inflamatórias são diminuídas em indivíduos obesos (ANURADHAA et al., 2016).

Nossos dados demonstram que houve uma diminuição significativa nos níveis de IL-10 nos animais obesos no tempo de 48 h quando comparados aos animais eutróficos no mesmo tempo de infecção (Figura 24).

Figura 24 - Estudo da síntese de IL-10 por leucócitos pleurais infectados ou não por *Mycobacterium bovis* BCG após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção.



Análise da síntese IL-10 provenientes de lavados pleurais de camundongos eutróficos ou obesos. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. Cada barra representa a média, \pm erro padrão de no mínimo 5 animais por grupo. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). A diferença entre os grupos Eutrófico e Obeso foi expressa por # ($p < 0,005$). A diferença entre os tempos de infecção de um mesmo grupo expressa por @ ($p < 0,005$). Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG INDUZ AUMENTO DOS INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS INTESTINAIS NOS CAMUNDONGOS OBESOS MAIS PRECOCEMENTE QUE EM CAMUNDONGOS EUTRÓFICOS

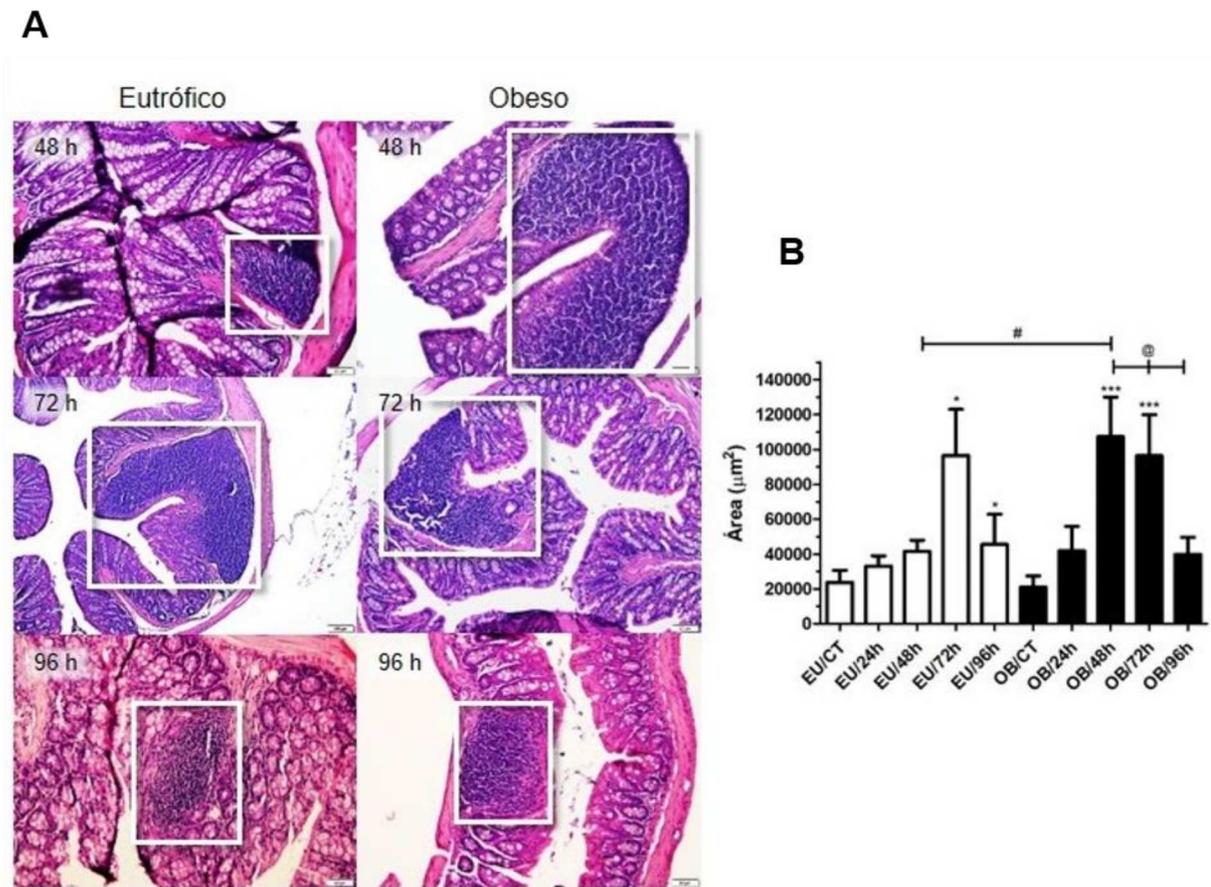
O consumo de dieta hiperlipídica contribui para o rompimento da barreira epitelial intestinal que promove o aumento da circulação de lipopolissacarídeos (LPS),

ativação de células do sistema imune intestinais (CAESAR et al., 2012; SITTIPO et al., 2018).

Desta forma, no presente estudo, propusemos avaliar a influência da infecção por *Mycobacterium bovis* BCG no contexto de obesidade.

Nossas análises realizadas a partir dos cortes histológicos da porção final do intestino grosso dos camundongos demonstraram que houve um aumento significativo na área de infiltrados inflamatórios em resposta à infecção (Figura 25A). Além disso, foi possível observar que a obesidade parece acelerar o aumento dessas áreas no tempo de 48 horas (Figura 25B). No entanto, de forma interessante, em ambos os grupos (eutrófico e obeso), houve uma redução significativa na área dos infiltrados inflamatórios após 96 horas de infecção (Figura 25B).

Figura 25 - Infiltrado inflamatório na porção final do intestino de camundongos eutróficos e obesos infectados ou não por *Mycobacterium bovis* BCG nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h.



(A) Histologia da porção final do intestino de camundongos eutróficos ou obesos infectados por *M. bovis* BCG nos tempos de 48 h, 72 h e 96 h, corada com hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas em microscópio Olympus DP73 através do programa CellSens Dimension. (B) Área relativa ao tamanho do infiltrado inflamatório. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. Cada barra representa a média, \pm erro padrão de no mínimo 5 animais por grupo. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). A diferença entre os grupos Eutrófico e Obeso foi expressa por # ($p < 0,005$). A diferença entre os tempos de infecção de um mesmo grupo expressa por @ ($p < 0,005$). Fonte: Elaborado pela autora.

4.8 A OBESIDADE RETARDOU A MUDANÇA DA ESTRUTURA DA MICROBIOTA INTESTINAL DOS CAMUNDONGOS FRENTE A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG

Dietas ricas em gorduras levam à mudanças na composição microbiana intestinal que estão relacionadas a efeitos prejudiciais na saúde dos indivíduos (TURNBAUGH et al., 2010). Além disso, doenças infecciosas como a TB, também são capazes de levar à disbiose da microbiota intestinal (HU et al., 2019). Assim nesse

estudo, analisamos o impacto da comorbidade obesidade-tuberculose nas alterações da MI de camundongos eutróficos e obesos infectados ou não por BCG.

A estrutura da microbiota intestinal foi analisada a partir de amostras fecais coletadas dos camundongos infectados ou não nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas no experimento 1 (Figura 26) e nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h no experimento 2 (Figura 27).

Observamos que os camundongos obesos possuem sua composição da estrutura da microbiota intestinal distinta (OB/CT), quando comparados aos animais eutróficos (EU/CT) nos dois experimentos realizados (Figura 26A e 27A).

Após a infecção dos camundongos eutróficos por *M. bovis* BCG, em ambos os experimentos, houve uma rápida mudança na estrutura da microbiota intestinal nos grupos infectados nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Já no grupo obeso essa mudança da estrutura da microbiota intestinal foi mais lenta, sendo observadas mudanças sutis nos tempos de 24 e 48 horas pós infecção no experimento 1 (Figura 26A) e nos tempos de 24, 48 e 72 h no experimento 2 (Figura 27A).

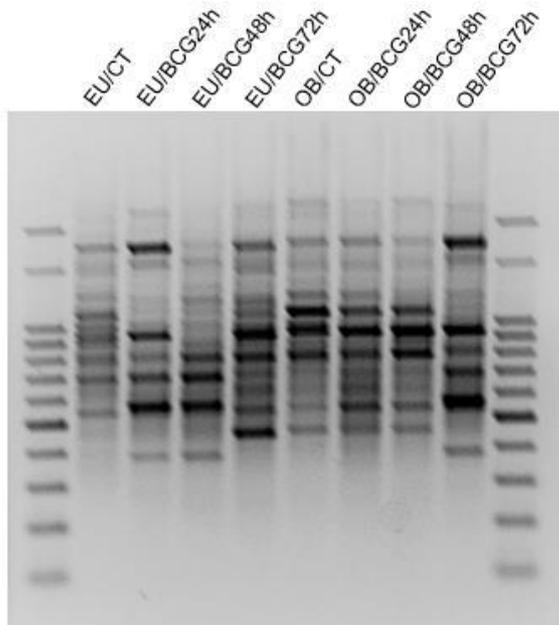
Interessantemente, no experimento 1, após 72 horas de infecção, a estrutura da microbiota intestinal dos animais obesos aproximou-se do perfil microbiano dos animais eutróficos infectados após 24 horas, apresentando 97,3% de similaridade. Esta observação nos conduziu ao experimento 2, em que foi analisado o tempo de 96 h de infecção.

No experimento 2, animais obesos infectados no tempo de 96 h apresentam a estrutura da microbiota intestinal com o menor percentual de similaridade (55,1%) quando comparado a todos os outros grupos de animais estudados (Figura 27B).

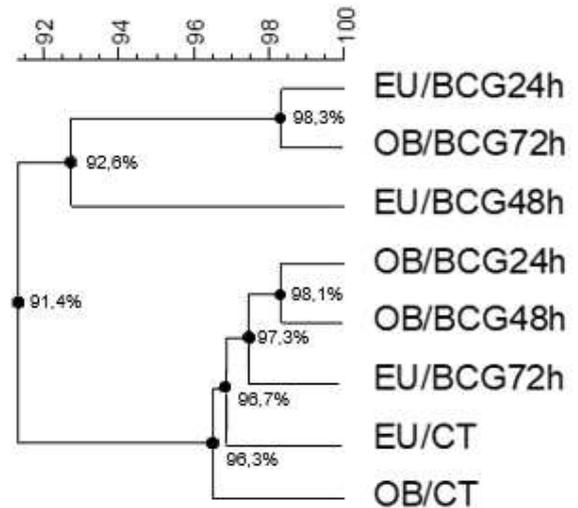
Figura 26 - Análise da composição estrutural da microbiota de camundongos eutróficos ou obesos, infectados ou não por *Mycobacterium bovis* BCG nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h.

Experimento 1:

A



B

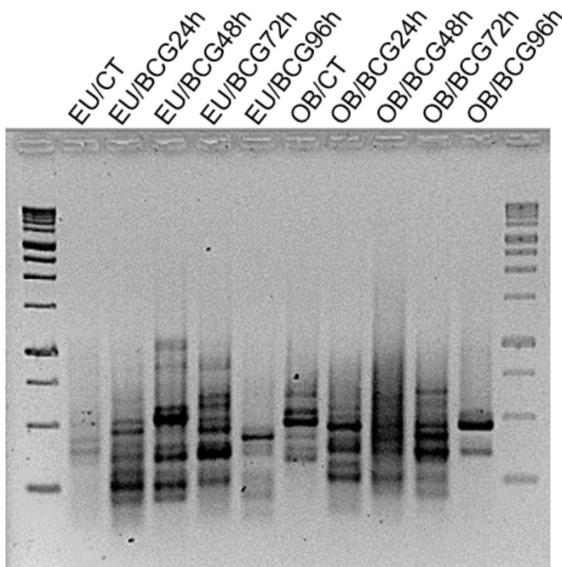


(A) *Fingerprint* obtido após amplificação de fragmentos do genoma bacteriano por rep-PCR a partir do DNA metagenômico extraído das amostras fecais de camundongos. (B) Dendrograma obtido pela análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do genoma bacteriano amplificados por rep-PCR a partir do DNA metagenômico extraído das amostras fecais de camundongos eutróficos e obesos. Amostras fecais foram coletadas diariamente para identificar a composição da estrutura microbiana intestinal. O DNA foi extraído seguindo protocolo de utilização de fenol-clorofórmio por Stevenson e Weimer, 2007. Fonte: Elaborado pela autora.

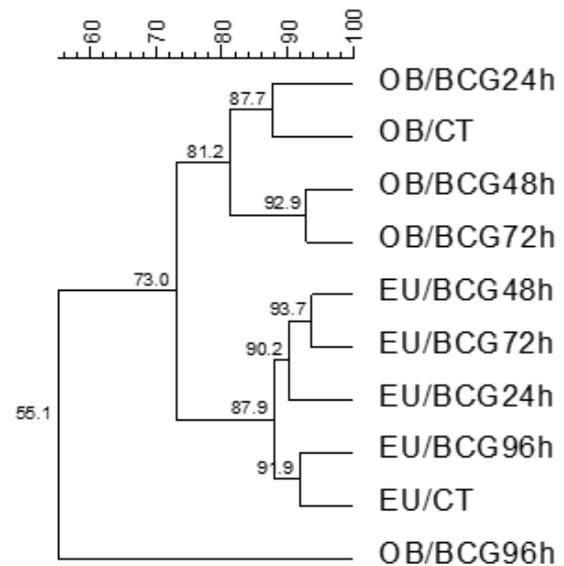
Figura 27 - Análise da composição estrutural da microbiota de camundongos eutróficos ou obesos, infectados ou não por *Mycobacterium bovis* BCG nos tempos de 0, 24, 48, 72 h e 96 h.

Experimento 2:

A



B



(A) *Fingerprint* obtido após amplificação de fragmentos do genoma bacteriano por rep-PCR a partir do DNA metagenômico extraído das amostras fecais de camundongos. (B) Dendrograma obtido pela análise de agrupamento do perfil de bandas de fragmentos do genoma bacteriano amplificados por rep-PCR a partir do DNA metagenômico extraído das amostras fecais de camundongos eutróficos e obesos. Amostras fecais foram coletadas diariamente para identificar a composição da estrutura microbiana intestinal. O DNA foi extraído seguindo protocolo de utilização de fenol-clorofórmio por Stevenson e Weimer, 2007. Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou compreender a influência da obesidade no curso da tuberculose experimental com enfoque investigativo no metabolismo lipídico e resposta inflamatória, no que diz respeito a formação de corpúsculos lipídicos, produção de citocinas, alterações da estrutura da microbiota intestinal e processos inflamatórios intestinais.

Estudos apontam para um possível papel protetor da obesidade no desenvolvimento da tuberculose (COLLEEN F. HANRAHAN et al., 2010; CORNONI-HUNTLEY, 2018; KIM et al., 2018; LIN et al., 2018). E dados da literatura demonstraram uma relação log-linear inversa na incidência de TB e o IMC dentro da faixa de 18,5-30 kg/m² (LÖNNROTH et al., 2010). Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda precisam ser melhor investigados e esclarecidos.

Nosso trabalho demonstrou a eficiência da dieta hiperlipídica no desenvolvimento de um quadro de sobrepeso ou obesidade nos camundongos alimentados por um período de 12 semanas. Para isso, foi avaliada a progressão da média do peso desses animais que se mostrou superior em relação aos animais eutróficos. Além disso, analisamos o Índice de Lee, que é o cálculo utilizado para predição da obesidade, que corroborou com os resultados anteriores. Demonstramos que o peso das gorduras perigonadais e retroperitoneais dos animais obesos são significativamente superiores às gorduras dos camundongos eutróficos, bem como suas respectivas proporções em relação ao peso final dos animais.

Outro dado analisado foi quanto à progressão de ganho ou perda de peso dos animais após infecção intrapleural com *M. bovis* BCG. Nossos dados, demonstraram uma perda gradual e significativa de peso dos animais obesos infectados após um período de 96 horas. Entretanto, nos animais eutróficos essa perda de peso não foi observada, mas sim um ganho significativo após 96 h de infecção. Este dado nos leva a acreditar que a infecção por si só, não é capaz de induzir a perda de peso dos animais e outros fatores devem estar envolvidos nesse evento.

Nosso grupo já demonstrou que a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG induz maior acúmulo de corpúsculos lipídicos em macrófagos e que o aumento do número dessa organela pode favorecer a sobrevivência do patógeno. Além disso, este mecanismo é um evento altamente regulado e dependente da ativação de fatores transcricionais, como o PPAR γ com funções na ativação celular no que diz respeito

tanto no metabolismo lipídico quanto resposta inflamatória do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2009, 2012, 2014; RAJARAM et al., 2010; FATIMA et al., 2020). O PPAR γ é fundamental na regulação do metabolismo lipídico, formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores lipídicos como PGE2 na resposta à infecções micobacterianas (ALMEIDA et al., 2009).

Durante a infecção por *M. bovis* BCG, a indução da resposta do hospedeiro, leva ao aumento da expressão e ativação de PPAR γ , através de vias independentes de NF- κ B se dá por associação entre CD36-TLR2, juntamente à CD11b e CD14 que estão compartimentalizados em “*lipid-rafts*”, gerando, assim, um aumento do acúmulo de lipídios em macrófagos e modulação da resposta imune (ALMEIDA et al., 2014). A expressão de PPAR γ e concentração de lipídios de macrófagos após infecção por *M. bovis* é devido à sinalização de TLR2 (ALMEIDA et al., 2009) e diferentes vias de sinalização do TLR2 estão envolvidas na expressão de citocinas e na regulação do metabolismo lipídico (ALMEIDA et al., 2014). Além disso, estudos já demonstraram a presença de CL dentro dos fagossomos contendo micobactérias, o que indica que os patógenos podem ser favorecidos pelo conteúdo lipídico de seu hospedeiro, como mecanismo de sobrevivência e escape (D’AVILA et al., 2006; PEYRON et al., 2008).

Assim, corroborando com os estudos anteriores, no presente trabalho foi possível demonstrar que a infecção *in vivo* por *M. bovis* BCG induz aumento na formação de corpúsculos lipídicos em camundongos e seu pico de formação ocorre no tempo de 48 horas nos grupos eutrófico e obeso. Entretanto, após 96 horas de infecção, em ambos os grupos, observamos uma diminuição significativa na formação de CL, o que nos leva a acreditar que este evento está relacionado a ativação da resposta do hospedeiro frente à infecção é dependente do curso da infecção. Também observamos diferenças significativas na biogênese dessas organelas em camundongos obesos nos tempos de 72 e 96 horas comparados aos eutróficos nos mesmos tempos de infecção, demonstrando que a obesidade influencia positivamente a formação de CL.

As células responsáveis pela fagocitose de micobactérias patogênicas, em resposta à infecção, produzem citocinas que auxiliam no combate ao patógeno. Durante a resposta imunológica, o que determina a eliminação ou sobrevivência do patógeno é o equilíbrio da produção de citocinas pró- e antiinflamatórias (RUSSELL et al., 2010). Os macrófagos são capazes de eliminar patógenos intracelulares através

da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), citocinas pró-inflamatórias, acidificação do fagossomo, autofagia e apoptose (HMAMA et al., 2015).

Neste estudo, analisamos a síntese e secreção de citocinas por leucócitos pleurais de camundongos C57BL/6. Avaliamos, a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e KC e da citocina anti-inflamatória IL-10. Como esperado, um aumento significativo nos níveis de TNF- α e KC frente a infecção por *M. bovis* BCG foi observado e, apesar de não apresentar diferenças estatísticas, o perfil de aumento da secreção dessas citocinas durante a obesidade tende a ser mais expressivo, corroborando com a literatura (ANURADHAA et al., 2016; VALLOCHI et al., 2018). Em relação à IL-10, uma citocina antiinflamatória, menores níveis foram observadas nos animais obesos após 48 horas quando comparados aos animais eutróficos no mesmo tempo de infecção, também corroborando com a literatura que diz que citocinas antiinflamatórias tem seus níveis diminuídos durante a obesidade (ANURADHAA et al., 2016).

O consumo de uma dieta hiperlipídica pode acarretar também uma maior inflamação intestinal o qual pode ser associado a uma alteração da microbiota intestinal, que é responsável por aumentar o nível de LPS circulante, influenciando, assim, na progressão da obesidade e no desenvolvimento da resistência à insulina em diabetes tipo 2 (DING et al., 2010). A disbiose intestinal leva à ruptura da barreira epitelial intestinal, acarretando no aumento da circulação de células do sistema imune e secreção de citocinas que podem ser de caráter pró-inflamatório, como no caso da obesidade (SITTIPO et al., 2018). A disbiose também pode ser causada por doenças infecciosas, como a tuberculose levando a uma significativa alteração da microbiota intestinal e de suas funções metabólicas (HU et al., 2019).

Além disso, já foi demonstrada a influência da microbiota intestinal no desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro uma vez que a linha de frente de defesa da mucosa intestinal é prejudicada na ausência dos microrganismos intestinais (MACPHERSON; HARRIS, 2004; PATTERSON et al., 2016), levando, também, à diminuição de ácidos graxos de cadeia curta circulantes no intestino (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012) e alterações de genes que codificam hormônios fundamentais, como a leptina, que conferem saciedade ao indivíduo (LEY et al., 2005).

Assim, avaliamos a influência da obesidade no aumento da área de infiltrados inflamatórios no intestino de camundongos. Observamos um aumento significativo das áreas dos infiltrados inflamatórios em ambos os grupos frente à infecção por *M. bovis*

BCG. Foi possível observar que a obesidade foi capaz de acelerar esse aumento em 48 horas de infecção. Entretanto, após 96 horas de infecção, em ambos os grupos, é observada uma drástica redução na área dos infiltrados inflamatórios. Esses dados, sugerem que os níveis basais de infiltrados inflamatórios são mantidos para manter a resposta à infecção por *M. bovis* BCG após 96 h de infecção. Entretanto, outros fatores são necessários para melhor compreender a influência da obesidade no curso da Tuberculose.

Em estudos anteriores, foi demonstrado que o risco do desenvolvimento de tuberculose em pacientes infectados com o vírus do HIV, na África do Sul, nas categorias de abaixo do peso, normal, sobrepeso e obesidade possuem suas respectivas incidências em caráter decrescente, demonstrando que o IMC elevado protege contra a progressão da tuberculose nesses indivíduos (COLLEEN F. HANRAHAN et al., 2010). Em estudo de avaliação dos riscos de fatores nutricionais na tuberculose entre indivíduos adultos dos Estados Unidos foi relatada incidência de 24.7 a cada 10^4 pessoas por ano em indivíduos com IMC dentro da normalidade. Já em indivíduos abaixo do peso, com sobrepeso e obesos os índices foram 260,2, 8,9, 5,1, respectivamente (CORNONI-HUNTLEY, 2018). Em estudo realizado na Coreia, resultados similares ao último descrito foram encontrados, sugerindo que aumento no IMC pode estar associado à diminuição do risco de TB, entretanto seus achados demonstraram que em índices muito elevados não ocorreu diminuição desse risco em mulheres jovens ou em diabéticos que compuseram a base de dados da pesquisa (KIM et al., 2018). Através da realização de metanálise de diferentes estudos acerca da relação entre o estado nutricional e a tuberculose, então, foi possível demonstrar uma relação log-linear inversa na incidência de TB e o IMC dentro da faixa de 18,5-30 kg/m² (LÖNNROTH et al., 2010).

Diante desses dados da literatura, podemos sugerir com análise dos nossos dados, que a dieta hiperlipídica foi capaz de gerar um quadro de sobrepeso ou obesidade, que veio acompanhado de alterações na estrutura da microbiota intestinal entre os camundongos alimentados com dieta padrão e aqueles alimentados com dieta hiperlipídica durante 12 semanas, corroborando com os dados de estudos anteriores.

Foi observada uma certa resistência na alteração da estrutura microbiana dos animais obesos e sua consequente estimulação do sistema imune pode estar associada à um efeito protetor no desenvolvimento da tuberculose nesses animais.

Além disso, a aparente semelhança no perfil microbiano de animais obesos após 72 h de infecção e de animais eutróficos com 24 h (98,3% de similaridade) nos leva a acreditar que este pode ser um dos fatores, entre outros, os quais podem induzir a perda de peso desses animais ao longo do tempo de infecção.

Desta maneira, a investigação dos mecanismos fundamentais na interação e alterações provocadas pela infecção – e o impacto na microbiota residente ou vice-versa, no âmbito da comorbidade obesidade-tuberculose, podendo garantir melhores estratégias de controle de infecções por patógenos intracelulares *in vivo*. Todos esses dados reforçam a importância da investigação do papel da microbiota em resposta à diversas doenças metabólicas e/ou de caráter infeccioso, abrindo a possibilidade de desenvolvimento de terapias de restauração microbiana de caráter benéfico para essas e outras patologias.

6 CONCLUSÕES

- Houve perda significativa de peso apenas em animais obesos após 96 h de infecção;

- A biogênese de corpúsculos lipídicos foi influenciada pela obesidade nos tempos 72 e 96 h durante a infecção micobacteriana;

- A infecção por *M. bovis* BCG modulou positivamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e KC) e este perfil, apesar de não apresentar diferenças significativas, mostrou-se mais expressivo no grupo dos obesos. Além disso, houve diminuição nos níveis de IL-10 citocina de perfil anti-inflamatório, em camundongos obesos após 48 h de infecção;

- A obesidade parece acelerar o aumento de áreas de infiltrados inflamatórios nos intestinos dos camundongos com 48 horas de infecção. Entretanto, camundongos eutróficos e obeso após 96 h de infecção, tiveram uma redução significativa na área dos infiltrados inflamatórios;

- Os animais obesos apresentam uma estrutura microbiana diferente dos animais eutróficos. Mudanças da estrutura da microbiota intestinal de animais eutróficos e obesos foi observada após a infecção por BCG, sendo que os animais obesos no tempo de 72 h apresentam alterações do perfil microbiano intestinal que se assemelharam ao perfil dos eutróficos infectados no tempo de 24 h. Entretanto, após 96 h de infecção os animais eutróficos e obesos apresentam uma estrutura microbiana totalmente diferente de todos os outros grupos estudados;

Alterações na composição da microbiota intestinal e suas funções em resposta a várias doenças ainda são pouco compreendidas e torna necessária a investigação mais aprofundada acerca de suas interações com o sistema imune.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. E. et al. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1337–1345, 2009.
- ALMEIDA, P. E. et al. PPAR γ Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. **PPAR Research**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- ALMEIDA, P. E. et al. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 1, p. 97–107, 2014.
- AN, I.; STATES, U.; STATES, U. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. **Obesity research**, v. 6 Suppl 2, n. September, 1998.
- ANDREAZZI, A. E. et al. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium l-glutamate-obesity in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 201, n. 3, p. 351–359, 2009.
- ANES, E. et al. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 793–802, 2003.
- ANURADHAA, RAJAMANICKAM; MUNISANKARA, SARAVANAN; BHOOTRAA, YUKTHI; DOLLAB, CHANDRAKUMAR; KUMARANB, PAUL; BABU, S. High body mass index is associated with heightened systemic and mycobacterial antigen – Specific pro-inflammatory cytokines in latent tuberculosis. **HHS Public Access**, v. 101, n. 6, p. 56–61, 2016.
- ARMSTRONG, J. A.; D'ARCY HART, P. Phagosome lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **Journal of Experimental Medicine**, v. 142, n. 1, p. 1–16, 1975.
- BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718–23, 2004.
- BÄCKHED, F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 979–984, 2007.
- BAFICA, A. et al. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase–dependent lipoxin production. **Conflict**, v. 115, n. 6, p. 1601–1606, 2005.
- BENSINGER, S. J.; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 470–477, 2008.
- BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular

- disease. **Circulation Research**, v. 96, n. 9, p. 939–949, 2005.
- BLASER, M. J.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G. The Human Microbiome before Birth. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 5, p. 558–560, 2016.
- BOSCH, M.; PARTON, R. G.; POL, A. Lipid droplets, bioenergetic fluxes, and metabolic flexibility. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, n. February, p. 0–1, 2020.
- BOUTENS, L.; STIENSTRA, R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. **Diabetologia**, v. 59, n. 5, p. 879–894, 2016.
- BOZZA, P. T. et al. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: Cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 11091–11096, 1996.
- BOZZA, P. T. et al. Pathways for eosinophil lipid body induction: Differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 4, p. 563–569, 1998.
- BOZZA, P. T. et al. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 205–213, 2011.
- BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies — Biogenesis and functions in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 6, p. 540–551, jun. 2009.
- BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 30–49, 2007.
- BRASAEMLE, D. L. et al. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46835–46842, 2004.
- BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Pro-Resolving lipid mediators and Mechanisms in the resolution of acute inflammation Christopher. v. 40, n. 3, p. 315–327, 2014.
- CAESAR, R. et al. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. **Gut**, v. 61, n. 12, p. 1701–1707, 2012.
- CALDER, P. C. et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. S3, p. S5–S78, 2011.
- CASPER, C. et al. HIV/AIDS Comorbidities: Impact on Cancer, Noncommunicable Diseases, and Reproductive Health. **Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 6): Major Infectious Diseases**, p. 45–66, 2017.
- CHAWLA, A. et al. Nuclear Receptors and Lipid Physiology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866–1870, 2001.
- CHEN, M. et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: Opposing

- roles of PGE 2 and LXA 4 in the induction of macrophage death. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 12, p. 2791–2801, 2008.
- CHRISTAKIS, N. A.; FOWLER, J. H. The spread of obesity in a large social network over 32 years. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 4, p. 370–379, 2007.
- CHURCHYARD, G. et al. What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 6, p. S629–S635, 2017.
- COLLEEN F. HANRAHAN, J. E. G. et al. Body mass index and risk of tuberculosis and death. **Aids**, v. 24, n. 10, p. 1501–1508, 2010.
- COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 252–260, 2011.
- CORNONI-HUNTLEY, J. Nutritional Risk Factors for Tuberculosis Among Adults in the United States, 1971–1992. v. 176, n. 5, p. 409–422, 2018.
- CORRÊA; HEYN; MAGALHAES. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 662, 2019.
- CURAT, C. A. et al. Curat 2004, Diabetes. Monocitos pl a macróf TA.pdf. v. 53, n. May, 2004.
- CURAT, C. A. et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: Increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. **Diabetologia**, v. 49, n. 4, p. 744–747, 2006.
- D'AVILA, H. et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 5, p. 3087–97, 2006.
- D'AVILA, H. et al. Host cell lipid bodies triggered by Trypanosoma cruzi infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 951–961, 2011.
- D'AVILA, H.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; BOZZA, P. T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1308–1315, 2008.
- DANIEL, H. et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. **ISME Journal**, v. 8, n. 2, p. 295–308, 2014.
- DAS, B. et al. CD271+ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells May Provide a Niche for Dormant Mycobacterium tuberculosis. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.
- DAVE, M. et al. The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions. **Translational Research**, v. 160, n. 4, p. 246–257, 2012.
- DE ALMEIDA, P. E. et al. Lipid bodies as sites of prostaglandin E2 synthesis during Chagas disease: Impact in the parasite escape mechanism. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 2018.
- DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the**

- National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–6, 2010.
- DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 332–338, 2012.
- DE MATTOS, K. A. et al. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: Multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 156–166, 2012.
- DE WIT, N. et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 5, p. G589–G599, 2012.
- 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.
- DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. E. Perspectives on host adaptation in response to *Mycobacterium tuberculosis*: Modulation of inflammation. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 533–542, 2014.
- EGUCHI, A. et al. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. v. 94, n. 11, p. 1241–1253, 2017.
- ENGIN, A. B.; ENGIN, A. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, p. 327–343, 2017.
- ETNA, M. P. et al. Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 543–551, 2014.
- FANALE, D.; AMODEO, V.; CARUSO, S. The Interplay between Metabolism, PPAR Signaling Pathway, and Cancer. **PPAR Research**, v. 2017, 2017.
- FARESE, R. V; WALTHER, T. C. SOS-->Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T.\nLeei kai gia targeting panw sto droplet! **Cell**, v. 139, n. 5, p. 855–60, 2009.
- FATIMA, S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* programs mesenchymal stem cells to establish dormancy and persistence. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 2, p. 655–661, 2020.
- FOMBY, P.; CHERLIN, A. J. Role of microbiota in immunity and inflammation. **National Institute of Health**, v. 72, n. 2, p. 181–204, 2011.
- GEARING, K. L. et al. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 4, p. 1440–1444, 1993.
- GENOLET, R. et al. Promoter rearrangements cause species-specific hepatic regulation of the glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase gene by the peroxisome proliferator-activated receptor α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 24143–24152, 2005.
- GETAHUN, H. et al. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 22, p. 2127–2135, 2015.

- GLASS, C. K.; SAIJO, K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 365–376, 2010.
- GRAF, D. et al. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 0, p. 1–11, 2015.
- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 2011.
- GRIS, D. Cytokine and lipid mediator networks in tuberculosis Katrin. v. 185, n. 2, p. 974–981, 2013.
- GUZIK, T. J.; MANGALAT, D.; KORBUT, R. Adipocytokines - Novel link between inflammation and vascular function? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 505–528, 2006.
- HAN, J. L.; LIN, H. L. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: From mechanism insights to therapeutic perspective. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 47, p. 17737–17745, 2014.
- HARMAN-BOEHM, I. et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: Effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 6, p. 2240–2247, 2007.
- HELLMANN, J. et al. Increased Saturated Fatty Acids in Obesity Alter Resolution of Inflammation in Part by Stimulating Prostaglandin Production. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 3, p. 1383–1392, 2013.
- HEMING, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ modulates the response of macrophages to lipopolysaccharide and glucocorticoids. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.
- HERDER, C. et al. Inflammation and type 2 diabetes: Results from KORA Augsburg. **Gesundheitswesen**, v. 67, n. SUPPL. 1, 2005.
- HERDER, C. et al. Systemic immune mediators and lifestyle changes in the prevention of type 2 diabetes: Results from the Finnish Diabetes Prevention Study. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2340–2346, 2006.
- HMAMA, Z. et al. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 220–232, 2015.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 2007.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 2006.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.
- HU, Y. et al. The Gut Microbiome Signatures Discriminate Healthy From Pulmonary Tuberculosis Patients. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n.

April, p. 1–8, 2019.

HUAMAN, M. A. et al. Latent tuberculosis infection is associated with increased unstimulated levels of interferon-gamma in Lima, Peru. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–9, 2018.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPARgamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokine. **Nature**, v. 391, n. January, p. 82–86, 1998.

JIN, C.; HENAO-MEJIA, J.; FLAVELL, R. A. Innate immune receptors: Key regulators of metabolic disease progression. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 6, p. 873–882, 2013.

KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 26–34, 2012.

KAUL, V. et al. An important role of prostanoid receptor EP2 in host resistance to mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 12, p. 1816–1825, 2012.

KELLER, H. et al. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 6, p. 2160–2164, 1993.

KENNEDY, A. et al. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 1, p. 1–4, 2008.

KHAN, A. et al. Mesenchymal stem cells internalize Mycobacterium tuberculosis through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017.

KIM, S. J. et al. Association of body mass index with incident tuberculosis in Korea. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–12, 2018.

KIMMEL, A. R. et al. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 3, p. 468–471, 2010.

KLANCIC, T.; REIMER, R. A. Gut microbiota and obesity: Impact of antibiotics and prebiotics and potential for musculoskeletal health. **Journal of Sport and Health Science**, v. 00, p. 1–9, 2019.

KNIGHT, R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. **The British journal of nutrition**, v. 113, p. S1–S5, 2015.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635–643, 2000.

KORY, N.; JR, R. V. F.; WALTHER, T. C. Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets Nora. **Physiology & behavior**, v. 26, n. 7, p. 535–546, 2016.

KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C.; THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: How a neutral lipid enters lipid droplets. **Traffic**, v. 9, n. 3, p. 338–352, 2008.

- LAFONTAN, M. FAT CELLS: Afferent and Efferent Messages Define New Approaches to Treat Obesity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 119–146, 2005.
- LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? **Science**, v. 330, n. 6012, p. 1768–1773, 2011.
- LERNER, T. R.; BOREL, S.; GUTIERREZ, M. G. The innate immune response in human tuberculosis. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1277–1285, 2015.
- LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005.
- LIN, H. H. et al. Association of obesity, diabetes, and risk of tuberculosis: Two population-based cohorts. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 5, p. 699–705, 2018.
- LIN, P. L. et al. Tumor necrosis factor and tuberculosis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 12, n. 1, p. 22–25, 2007.
- LINGALA, S. M.; GHANY, M. G. M. MHS. The Biophysics and Cell Biology of Lipid Droplets HHS Public Access. v. 25, n. 3, p. 289–313, 2016.
- LONGO, M. et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.
- LÖNNROTH, K. et al. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, n. 1, p. 149–155, 2010.
- LUGO-VILLARINO, G. et al. Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–9, 2012.
- LUMENG, C. N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.
- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. v. 4, n. June, p. 1626–1632, 2004.
- MANDARD, S. et al. Glycogen synthase 2 is a novel target gene of peroxisome proliferator-activated receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 9, p. 1145–1157, 2007.
- MARQUES, T. M. et al. Dietary trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid alters fatty acid metabolism and microbiota composition in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 5, p. 728–738, 2015.
- MATTOS, K. A. et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 3, p. 371–384, 2010.
- MATTOS, K. A. et al. Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival

in phagosomes. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 259–273, 2011.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 1–16, 2010.

MELO, R. C. N. et al. Lipid bodies in inflammatory cells: Structure, function, and current imaging techniques. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 540–556, 2011.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: Host defense or pathogen survival strategy? **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. 6, 2012.

MORTENSEN, R. et al. Cyclooxygenase inhibitors impair CD4 T cell immunity and exacerbate Mycobacterium tuberculosis infection in aerosol-challenged mice. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2019.

MUJICO, J. R. et al. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 4, p. 711–720, 2013.

MURPHY, E. F. et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: Relationship to diet, obesity and time in mouse models. **Gut**, v. 59, n. 12, p. 1635–1642, 2010.

NADRA, K. et al. Differentiation of Trophoblast Giant Cells and Their Metabolic Functions Are Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 8, p. 3266–3281, 2006.

O'GARRA, A. et al. **The Immune Response in Tuberculosis**. [s.l.: s.n.]. v. 31

OLOFSSON, S. O. et al. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 6, p. 448–458, 2009.

ONAL, G. et al. Lipid Droplets in Health and Disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.

PACHECO, P. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 Controls Microtubule-Driven Biogenesis and Leukotriene B₄ -Synthesizing Function of Macrophage Lipid Bodies Elicited by Innate Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8500–8508, 2007.

PANIAGUA, J. A. et al. Central obesity and altered peripheral adipose tissue gene expression characterize the NAFLD patient with insulin resistance: Role of nutrition and insulin challenge. **Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2014.

PANIAGUA, J. A. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. **World Journal of Diabetes**, v. 7, n. 19, p. 483, 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.

PATTERSON, E. E. et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. **Postgraduate**

Medical Journal, v. 92, n. 1087, p. 286–300, 2016.

PAUL, A. et al. Deficiency of Adipose Differentiation-Related Protein Impairs Foam Cell Formation and Protects Against Atherosclerosis. **Bone**, v. 102, n. 12, p. 1492–1501, 2008.

PEYRON, P. et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. 1–14, 2008.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, n. 1, p. 353–384, 2012.

RAGHUVANSHI, S. et al. Mycobacterium tuberculosis evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 50, p. 21653–21658, 2010.

RAJARAM, M. V. S. et al. Mycobacterium tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses Abul. v. 185, n. 2, p. 929–942, 2010.

RAY, I.; MAHATA, S. K.; DE, R. K. Obesity: An Immunometabolic Perspective. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. DEC, p. 1–9, 2016.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- α is a negative regulator of macrophage activation. **Neuroscience Letters**, v. 391, n. 3, p. 79–82, 1998.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. v. 10, n. 9, p. 943–948, 2010.

RUSSELL, D. G. Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. **Immunol Rev.**, v. 240, p. 252–268, 2011.

RUSSELL, D. G.; MWANDUMBA, H. C.; RHOADES, E. E. Mycobacterium and the coat of many lipids. **Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 3, p. 421–426, 2002.

RUTH E. LEY, PETER J. TURNBAUGH, SAMUEL KLEIN, J. I. G. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, 2006.

SCHÄFFLER, A.; SCHÖLMERICH, J. Innate immunity and adipose tissue biology. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 6, p. 228–235, 2010.

SCHMITZ, G.; M. GRANDL. Lipid homeostasis in macrophages – Implications for atherosclerosis. **Review in physiological Biochemistry Pharmacology**, v. 159, n. April, p. 1–77, 2008.

SERHAN, C, CHIANG N, VAN DYKE, T. Resolution Lipid Mediators. **Nat Rev Immuno**, v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.

SHOELSON, S. E. et al. Inflammation and insulin resistance Find the latest version : Review series Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. August, p. 1793–1801, 2006.

SITTIPO, P. et al. Intestinal microbiota and the immune system in metabolic diseases. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 154–162, 2018.

SPITS, H.; BERNINK, J. H.; LANIER, L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. **Nature immunology**, v. 17, n. 7, p. 758–64, 2016.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. p. 165–174, 2007.

TAN, N. S. et al. The Nuclear Hormone Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor / Potentiates Cell Chemotactism, Polarization, and Migration. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 20, p. 7161–7175, 2007.

TANG, W. H. W.; KITAI, T.; HAZEN, S. L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. v. 120, n. 7, p. 1183–1196, 2017.

TAUCHI-SATO, K. et al. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44507–44512, 2002.

THAISS, C. A. et al. The microbiome and innate immunity. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 65–74, 2016.

TIMOTHY E. O’SULLIVAN et al. Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

TOLEDO, D. A. M.; D’AVILA, H.; MELO, R. C. N. Host lipid bodies as platforms for intracellular survival of protozoan parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, p. 1–6, 2016.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242–9, 2012.

TRIGGIANI, M. et al. Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1181–1190, 1995.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480–484, 2009.

TURNBAUGH, P. J. et al. Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. **Sci Trans Med.**, v. 1, n. 39857, p. 1–19, 2010.

VALLOCHI, A. L. et al. Lipid droplet, a key player in host-parasite interactions. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.

VAN DER HEIJDEN, R. A. et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging**, v. 7, n. 4, p. 256–268, 2015.

VIEIRA-DE-ABREU, A. et al. Cross-talk between macrophage migration inhibitory factor and eotaxin in allergic eosinophil activation forms leukotriene C4-synthesizing lipid bodies. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44, n. 4, p. 509–516, 2011.

VIGITEL BRASIL 2017. **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 2017 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília: MS/CGDI, 2019.

VIGITEL. Fatores de risco e proteção para doenças crônicas. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, p. 44, 2016.

WALTHER, T. C.; CHUNG, J.; JR., R. V. F. Lipid droplet biogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 59, n. July, p. 88–96, 2017.

WALTHER, T. C.; FARESE, R. V. Lipid Droplets And Cellular Lipid Metabolism Tobias. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 687–714, 2012.

WANG, Y.; LIM, H.; CABALLERO, B. Use and interpretation of anthropometry. **Modern Nutrition in Health and Disease: Eleventh Edition**, p. 649–659, 2012.

WANG, Z. et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 57–65, 2011.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue Find the latest version : Obesity is associated with. **J Clin Invest.**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WHO. **Noncommunicable Diseases Country Profiles 2018**. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Organização Mundial da Saúde. 2018. “Obesity and Overweight.” Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 29 de junho de 2019.