

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

**Werner Vieira Vieira**

**COMORBIDADE OBESIDADE-TUBERCULOSE: INFLUÊNCIA NO  
SISTEMA IMUNE E NA MICROBIOTA INTESTINAL**

**Dissertação de Mestrado**

Juiz de Fora – MG  
2018

ICB/UFJF	WERNER VIEIRA VIEIRA	COMORBIDADE OBESIDADE-TUBERCULOSE:		2018
		INFLUÊNCIA NO SISTEMA IMUNE E NA MICROBIOTA INTESTINAL		

ICB/UFJF	WERNER VIEIRA VIEIRA	COMORBIDADE OBESIDADE-TUBERCULOSE:		2018
		INFLUÊNCIA NO SISTEMA IMUNE E NA MICROBIOTA INTESTINAL		

**WERNER VIEIRA VIEIRA**

**COMORBIDADE OBESIDADE-TUBERCULOSE: INFLUÊNCIA NO  
SISTEMA IMUNE E NA MICROBIOTA INTESTINAL**

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: Área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Elaine de Almeida**

Juiz de Fora - Minas Gerais  
Abril de 2018

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

Vieira, Werner Vieira.

Comorbidade obesidade-tuberculose: influência no sistema imune e na microbiota intestinal / Werner Vieira Vieira. -- 2018. 64 f. : il.

Orientadora: Patricia 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, 2018.

1. Obesidade. 2. Tuberculose. 3. Microbiota Intestinal. 4. Corpúsculo Lipídico. I. Almeida, Patricia Elaine de, orient. II. Título.

**WERNER VIEIRA VIEIRA**

**COMORBIDADE OBESIDADE-TUBERCULOSE: INFLUÊNCIA NO  
SISTEMA IMUNE E NA MICROBIOTA INTESTINAL**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas: Área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

---

Dr<sup>a</sup> Patricia Elaine de Almeida  
UFJF

---

Dr<sup>o</sup> Claudio Galuppo Diniz  
UFJF

---

Dr<sup>a</sup> Livia Teixeira  
IOC/FIOCRUZ-RJ

**13 de Abril de 2018**

## RESUMO

De acordo com a OMS, em 2014, 39% da população adulta mundial estava acima do peso e 13% foram diagnosticados com obesidade. A tuberculose (TB) é a segunda principal causa de morte por doenças infecciosas em todo o mundo. Estudos têm demonstrado que a obesidade ou o excesso de peso estão relacionados à diminuição do risco de desenvolver TB ativa. Além disso, demonstrou-se que as pessoas com alto índice de massa corporal têm níveis sistêmicos elevados da maioria das citocinas pró-inflamatórias e diminuição dos níveis de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, tanto os humanos obesos quanto os camundongos têm uma composição microbiana que é significativamente diferente dos grupos eutróficos, considerados magros, e podem ser responsáveis pelo surgimento da obesidade. Reconhece-se agora que a microbiota intestinal mantém uma interação complexa e recíproca com o sistema imune do hospedeiro. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar se a obesidade promove alterações fisiológicas em camundongos infectados com BCG, com foco nas mudanças da microbiota intestinal. Para isso foram utilizados camundongos C57/BL6 alimentados com dieta hiperlipídica ou padrão. Os camundongos foram infectados ou não com *M. bovis* BCG. Após 24, 48 ou 72h de infecção os camundongos foram eutanasiados em câmara de gás carbônico (CO<sub>2</sub>). As amostras fecais foram coletadas diariamente após a infecção para identificação da composição da estrutura microbiana intestinal. Um lavado pleural foi realizado e os leucócitos pleurais foram montados em lâminas para análise de corpúsculos lipídicos (CL) e o sobrenadante desse lavado foi utilizado para análise das citocinas. Além disso, a porção final do intestino foi coletada para análise histológica. As gorduras retroperitoneal e perigonadal foram retiradas para pesagem. Após 16 semanas, os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram-se obesos. Nós avaliamos que a infecção induziu a biogênese de corpúsculos lipídicos em ambos os camundongos eutróficos ou obesos. Além disso, camundongos obesos 72hs pós-infecção mostraram um aumento significativo no número de corpúsculos lipídicos, quando comparado aos camundongos eutróficos. Além disso, observamos que a infecção induziu um aumento na síntese de KC e TNF- $\alpha$ , e a obesidade não conseguiu alterar esses níveis. Em relação a IL-10, notamos uma redução nos níveis de síntese nos camundongos obesos com 72hs de infecção quando comparados aos camundongos eutróficos. Além disso, demonstramos que os camundongos obesos apresentaram um perfil estrutural da microbiota intestinal diferente quando comparado aos

eutróficos. Nos camundongos eutróficos, a infecção por *M. bovis* BCG modificou rapidamente a estrutura da comunidade microbiana, apresentando variações em 24, 48 e 72h. Observamos que a obesidade atrasou a mudança de estrutura da microbiota intestinal. Além disso, mudanças menores foram observadas com 24 e 48 horas após a infecção, no entanto, mudanças visíveis ocorreram após 72h de infecção. Além disso, um aumento da área de infiltrados inflamatórios intestinais em resposta a infecção foi observada no grupo obeso. Assim, sugerimos que a obesidade influencia o curso da infecção, modulando a biogênese de corpúsculos lipídicos, síntese de citocinas, infiltrados inflamatórios intestinais e composição estrutural de microbiota intestinal. Além disso, o possível efeito protetor da obesidade no desenvolvimento da tuberculose pode ocorrer de outras formas, pela resistência frente à mudança estrutural da microbiota intestinal e pela consequente estimulação do sistema imunológico.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the second leading cause of death from infectious diseases worldwide. According to WHO, by 2014, 39% of world's adult population were overweight and 13% were diagnosed with obesity. Studies have shown that obesity or overweight are related to a decreased risk of developing active TB. In addition, people with a high body mass index have been shown to have elevated systemic pro-inflammatory cytokine levels and decreased levels of anti-inflammatory cytokines. In addition, both obese humans and mice have a microbial composition that is significantly different from eutrophic groups, considered lean, and may be co-responsible for the emergence of obesity. It is now recognized that the intestinal microbiota maintains a complex and reciprocal interaction with the host immune system. Thus, the objective of this study is to evaluate whether obesity promotes physiological changes in mice infected with BCG, focusing on changes in the intestinal microbiota. C57/BL6 mice fed a standard or hyperlipidic diets were used. Mice were infected or not with *M. bovis* BCG. After 24, 48 or 72h of infection the mice were euthanized in a carbon dioxide chamber (CO<sub>2</sub>). Fecal samples were collected daily after infection to identify the composition of the intestinal microbial structure. Pleural lavage was performed and pleural leukocytes were mounted on laminae for analysis of lipid bodies (LB) and the supernatant of this lavage was used for cytokine analysis. In addition, the final portion of the intestine was collected for histological analysis. Retroperitoneal and perigonadal fats were removed for weighing. After 16 weeks, the mice fed a hyperlipid diet were obese. We evaluated that the infection induced the biogenesis of lipidic corpuscles in both eutrophic and obese mice. Moreover, obese mice 72h after infection showed a significant increase in lipid bodies as compared to eutrophic mice. In addition, we observed that the infection induced an increase in the synthesis of KC and TNF- $\alpha$ , and obesity failed to change these levels. Regarding IL-10, we observed a reduction in the synthesis levels in obese mice with 72h of infection when compared to eutrophic mice. Moreover, we demonstrated that the obese mice presented a structural profile of the intestinal microbiota different when compared to the eutrophic. In the eutrophic mice, *M. bovis* BCG infection rapidly modified the structure of the microbial community, showing variations in 24, 48 and 72 hours. We observed that obesity delayed the change in the structure of the intestinal microbiota. In addition, minor changes were observed at 24 and 48 hours post infection, however, visible changes occurred after 72h of infection. In addition, an increase in the area of inflammatory bowel infiltrates in



response to infection was observed in the obese group. Thus, we suggest that obesity influences the course of infection by modulating biogenesis of lipid bodies, cytokine synthesis, intestinal inflammatory infiltrates and structural composition of intestinal microbiota. Moreover, the possible protective effect of obesity on the development of tuberculosis may occur in other ways, by resistance to the structural change of the intestinal microbiota and by the consequent stimulation of the immune system.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição da obesidade pelo mundo.....	17
<b>Figura 2:</b> Alterações na composição e função da microbiota intestinal saudável e microbiota obesa.....	20
<b>Figura 3:</b> Composição da microbiota residente intestinal humana.....	22
<b>Figura 4:</b> Estimativa de novos casos de Tuberculose ao redor do mundo.....	25
<b>Figura 5:</b> Granuloma tuberculoso.....	26
<b>Figura 6:</b> Formação do corpúsculo lipídico.....	29
<b>Figura 7:</b> Diferentes marcações e funções em corpúsculos lipídicos.....	30
<b>Figura 8:</b> Desenho experimental.....	33
<b>Figura 9:</b> Peso médio dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.....	38
<b>Figura 10:</b> Índice de Lee dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.....	39
<b>Figura 11:</b> Comparação entre as gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos eutróficos ou obesos.....	40
<b>Figura 12:</b> Contagem total de células.....	41
<b>Figura 13:</b> Formação de Corpúsculos Lipídicos nas células do lavado pleural após 24, 48 ou 72 h de infecção por <i>M. bovis</i> BCG.....	42
<b>Figura 14:</b> Estudo da síntese de quimiocinas e citocinas de perfil pró-inflamatório produzidas por leucócitos pleurais infectados ou não por BCG após 24, 48 e 72 horas de infecção.....	43
<b>Figura 15:</b> Estudo da síntese de IL-10, uma citocina de perfil anti-inflamatório produzida por leucócitos pleurais infectados ou não por BCG após 24, 48 e 72 horas de infecção.....	44

<b>Figura 16:</b> Estudo da síntese da adipocina adiponectina produzida por leucócitos pleurais infectados ou não por BCG após 24, 48 e 72 horas de infecção.....	45
<b>Figura 17:</b> Infiltrado inflamatório intestinal de camundongos eutróficos e obesos infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG.....	46
<b>Figura 18:</b> Análise da composição estrutural da microbiota de camundongos eutróficos ou obesos, infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Risco relativo para doenças associadas à obesidade.....	18
<b>Tabela 2:</b> Protocolo de preparo da ração hiperlipídica.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 OBESIDADE.....	17
1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA MICROBIOTA RESIDENTE.....	20
1.3 TUBERCULOSE.....	24
1.4 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	28
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 ANIMAIS.....	33
3.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE.....	33
3.3 <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> , BCG.....	34
3.4 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	34
3.5 PLEURISIA INDUZIDA POR BCG.....	35
3.6 AQUISIÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
3.7 HISTOLOGIA DO INTESTINO.....	35
3.8 CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS.....	36
3.9 CONTAGEM DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	36
3.10 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	37
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 A dieta hiperlipídica foi capaz de induzir um quadro de obesidade.....	38
4.2 A infecção por <i>M. bovis</i> BCG promoveu o aumento da migração leucocitária.....	40
4.3 Camundongos obesos com 72h de infecção apresentaram número de corpúsculos lipídicos maior quando comparados aos eutróficos..	41
4.4 A síntese de KC e TNF- $\alpha$ foi aumentada pela infecção por <i>M.</i> <i>bovis</i> BCG.....	42
4.5 Foram observados menores níveis de IL-10 nos animais obesos com 48h de infecção quando comparados aos eutróficos.....	43

4.6 Camundongos obesos com 48h de infecção apresentam níveis elevados de adiponectina quando comparados aos eutróficos.....	44
4.7 A infecção por <i>M. bovis</i> BCG leva ao aumento de infiltrados inflamatórios intestinais nos animais obesos.....	45
4.8 A obesidade retardou a mudança da estrutura da microbiota intestinal frente a infecção por <i>M. bovis</i> BCG.....	46
5 DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÕES.....	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

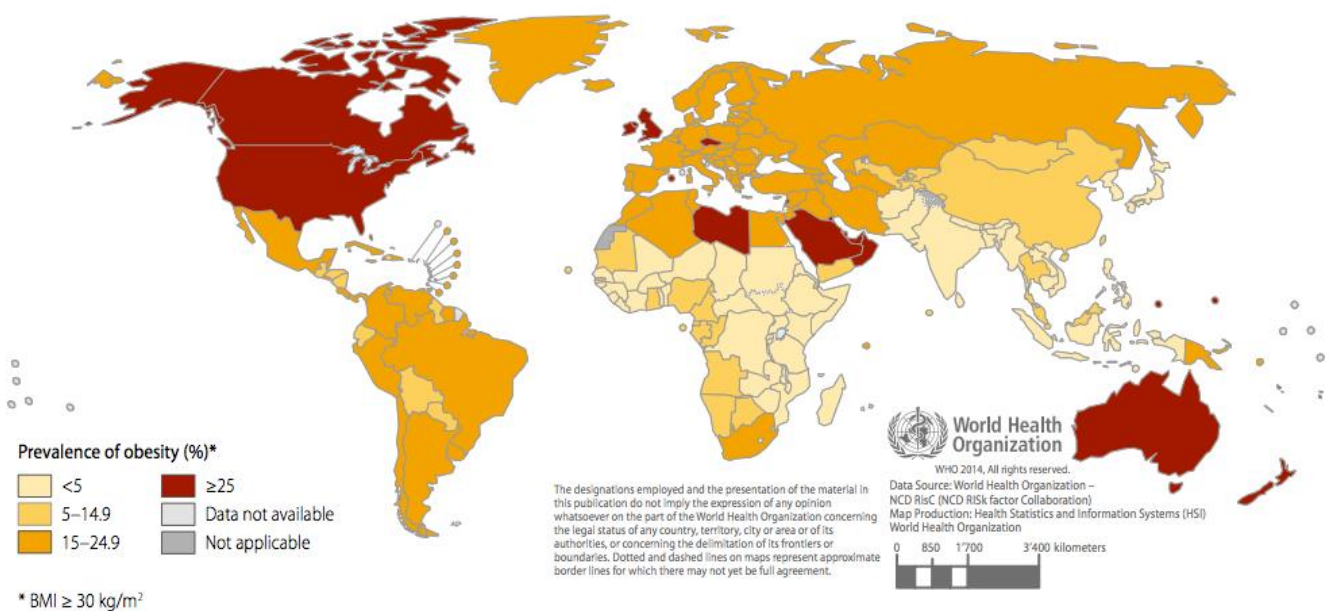


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

A obesidade tornou-se um problema mundial moderno. Em 2014, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), 39% da população adulta mundial apresentava sobrepeso e 13% estavam com diagnóstico de obesidade (Figura 1). No Brasil os números são ainda maiores, estudos recentes mostram que em 2014 os índices de sobrepeso e obesidade estavam em 52% e 17%, respectivamente (Ministério da Saúde, 2015). Devido à nova tendência de transição nutricional ocorrida neste século e a facilidade de acesso a alimentos com baixo valor nutricional e ricos em gorduras e açúcares, o desenvolvimento de sobrepeso e a evolução para a obesidade só tendem a aumentar.

Diversos fatores, além da dieta, parecem contribuir para o desenvolvimento da obesidade, como fatores genéticos, epigenéticos e psicológicos (Hotamisligil, 2006). A obesidade é caracterizada pelo aumento do peso corporal, por um estado inflamatório crônico e pelo desbalanceamento hormonal. Sendo que, indivíduos obesos apresentam uma fisiologia interna diferente dos indivíduos eutróficos.



**Figura 1. Distribuição da obesidade pelo mundo.** Adaptado de GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases, 2014, Organização Mundial da Saúde.

A obesidade é diagnosticada pelo Índice de Massa Corporal (IMC), que é o peso (em quilogramas) do indivíduo, dividido pelo quadrado da sua altura (em metros). Indivíduos com IMC entre 25-29,9 kg/m<sup>2</sup> são considerados com sobrepeso e IMC igual ou superior a 30 kg/m<sup>2</sup> são consideradas obesos.

A obesidade é o principal fator que leva ao desenvolvimento da síndrome metabólica. Essa síndrome é caracterizada por um conjunto de fatores de risco que podem coexistir e contribuir para o desenvolvimento de diferentes patologias, incluindo resistência à insulina, dislipidemia, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e inflamação, todas estritamente relacionadas com a adiposidade (Tabela 1)(de Heredia et al, 2012; Glass and Olefsky 2012; Guh et al, 2009)

	IMC*	
	Homens	Mulheres
<b>Diabetes tipo 2</b>	6,7	12,4
<b>Doença cardiovascular</b>		
Hipertensão	1,8	2,4
Doença arterial coronariana	1,7	3,1
Insuficiência cardíaca	1,8	1,8
Acidente vascular cerebral	1,5	1,5
Embolia pulmonar	3,5	3,5
<b>Câncer</b>		
Colo retal	1,9	1,7
Renal	1,8	2,6
Pancreático	2,3	1,6
Esofágico	1,2	1,2
De mama		1,1
De endométrio		3,2
Ovários		1,3
De próstata		1
<b>Outras</b>		
Doença biliar	1,4	2,3
Asma	1,4	1,8
Osteoartrite	4	2
Problemas de coluna	2,8	2,8

\*Índice de massa corporal  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup>

**Tabela 1. Risco relativo para doenças associadas à obesidade.**

Diversos fatores derivados não somente dos adipócitos, mas também de infiltrados de macrófagos, provavelmente contribuem para a patogênese da

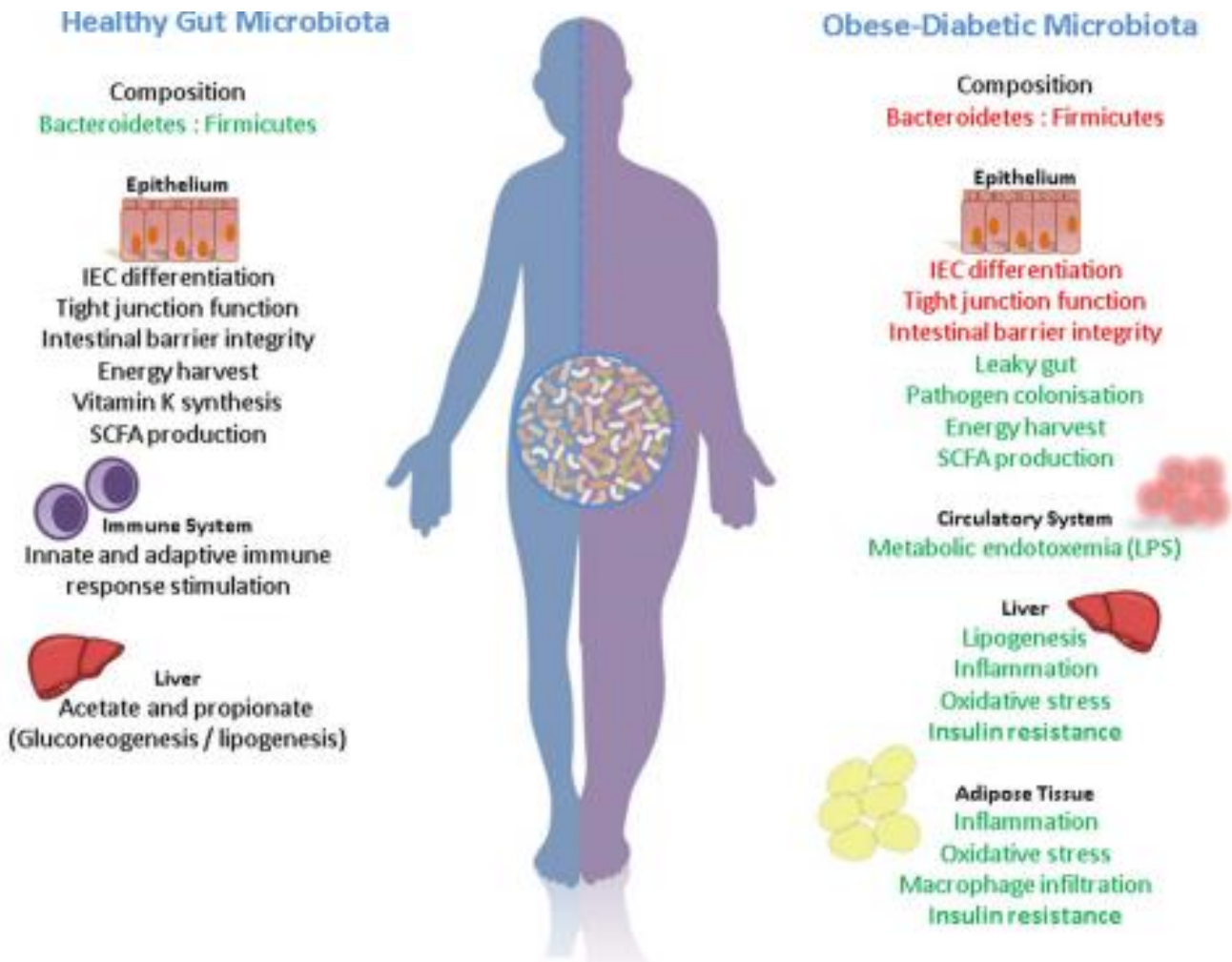
obesidade. O consumo excessivo de ácidos graxos saturados afeta o processo inflamatório de diferentes formas. Eles conseguem modular a atividade de fatores de transcrição envolvidos na inflamação, como NFκB e PPARγ (Calder et al., 2011), além de também serem associado à síndrome metabólica (Kennedy et al., 2008).

Citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-6, quimiocinas como MCP-1 e adipocinas como leptina e adiponectina já foram associadas à obesidade (Hotamisligil, 2006; Paniagua, 2016; Maury and Brichard, 2010; Hellmann et al, 2013; Ray, Mahata, and De, 2016; Guilherme et al, 2008). Alguns desses fatores acabam culminando num influxo de células do sistema imune para o tecido adiposo, contribuindo para a manutenção do estado inflamatório. Portanto, no tecido adiposo de indivíduos obesos ocorre uma alteração do perfil imunológico (Kalupahana et al., 2012; Kaminski & Schölmerich, 2010; Schäffler & Schölmerich, 2010), com aumento da expressão de TLR4, e consequente ativação de NFκB e produção de citocinas inflamatórias (Schäffler & Schölmerich, 2010). Linfócitos T CD8+ e linfócitos Th1 acabam migrando para o tecido adiposo e lá produzem citocinas e quimiocinas que atraem os macrófagos M1. Agora esses macrófagos também passam a secretar citocinas inflamatórias como TNF e IL-6 (Kaminski & Schölmerich, 2010; Schäffler & Schölmerich, 2010; Sell & Eckel, 2010) que acabam por estimular os pré-adipócitos a produzirem MCP-1/CCL2, atraindo novos macrófagos e aumentando o processo inflamatório associado à obesidade (Wellen & Hotamisligil, 2003).

As adipocinas também apresentam um papel chave na obesidade. A leptina é um hormônio que induz o gasto energético, regula o apetite (Kwon, Kim, and Kim, 2016; Varela and Horvath, 2012), além de promover a quimiotaxia de neutrófilos e a geração de espécies reativas de oxigênio (Genoni et al, 2014). Pessoas com deficiência na produção de leptina são mais susceptíveis a doenças infecciosas, com níveis mais baixos de IFN-γ, IL-4 e IL-10 e aumento de TGF-β (Lam and Lu, 2007). E em crianças, a deficiência parece favorecer o surgimento da obesidade infantil (Genoni et al, 2014). Mais recentemente, a adiponectina foi relacionada com a indução de citocinas como IL-6 e com a produção de PGE<sub>2</sub> (Lee et al, 2012), além de regular a expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Wulster-Radcliff et al, 2004) e de suprimir respostas dependentes de NF-κB (Rakatazi et al, 2004).

Estudos recentes demonstraram que tanto humanos como camundongos obesos apresentam uma composição e função microbiana intestinal

significativamente diferente dos eutróficos, considerados magros (Figura 2), sugerindo que a microbiota intestinal possa se corresponsabilizar para o surgimento da obesidade (Ley et al, 2005; DiBaise et al, 2008).



**Figura 2. Alterações na composição e função da microbiota intestinal saudável e microbiota obesa.** Os processos metabólicos em órgãos periféricos que levam ao aumento da adiposidade, inflamação, estresse oxidativo, resistência à insulina e lipogênese estão associados ao perfil alterado de microbiota associado ao fenótipo obeso. Adaptado de Patterson et al, 2016.

## 1.2 Características gerais da microbiota residente

Nos últimos anos, a microbiota residente tem emergido como um novo foco de estudos, mostrando-se um fator chave na regulação da fisiologia do indivíduo. Em humanos, a microbiota intestinal é composta de aproximadamente 100 trilhões de bactérias. Essa microbiota exerce variadas funções que contribuem para o

metabolismo de forma geral, fornecendo fatores de crescimento acessórios, facilitando a extração de energia dos alimentos, fornecendo resistência à colonização por patógenos invasores e estimulando tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo (Mackowiak, 1982; Crowe et al, 1973; Smith et al, 2007; da Silva et al, 2013) e que são indiscutivelmente tão importantes para a saúde metabólica quanto os próprios órgãos. Ao nascimento, nosso trato intestinal é estéril e a colonização e o estabelecimento da estrutura da microbiota dependerão de vários fatores, como o tipo de parto (normal ou cesárea), a alimentação, as medidas de higiene e também o uso de antibióticos (Bervoets et al, 2013).

A microbiota intestinal é composta não somente de procariotos, mesmo que estes representem a comunidade dominante (principalmente bactérias e arqueas), mas também de eucariotos (Parfrey et al, 2011). Atualmente, são reconhecidos pelo menos 10 filos bacterianos na microbiota intestinal humana (Figura 3). Os membros das divisões de Bacteroidetes e Firmicutes dominam a microbiota humana, representando 92,6% de todas as sequências de rRNA 16S recuperadas das amostras fecais de indivíduos saudáveis (Ley et al, 2006; Tap et al, 2009; Eckburg et al, 2005). Ao desenvolver da obesidade, é observado uma redução dos representantes de Bacteroidetes e um aumento proporcional de Firmicutes (Ley et al, 2005).

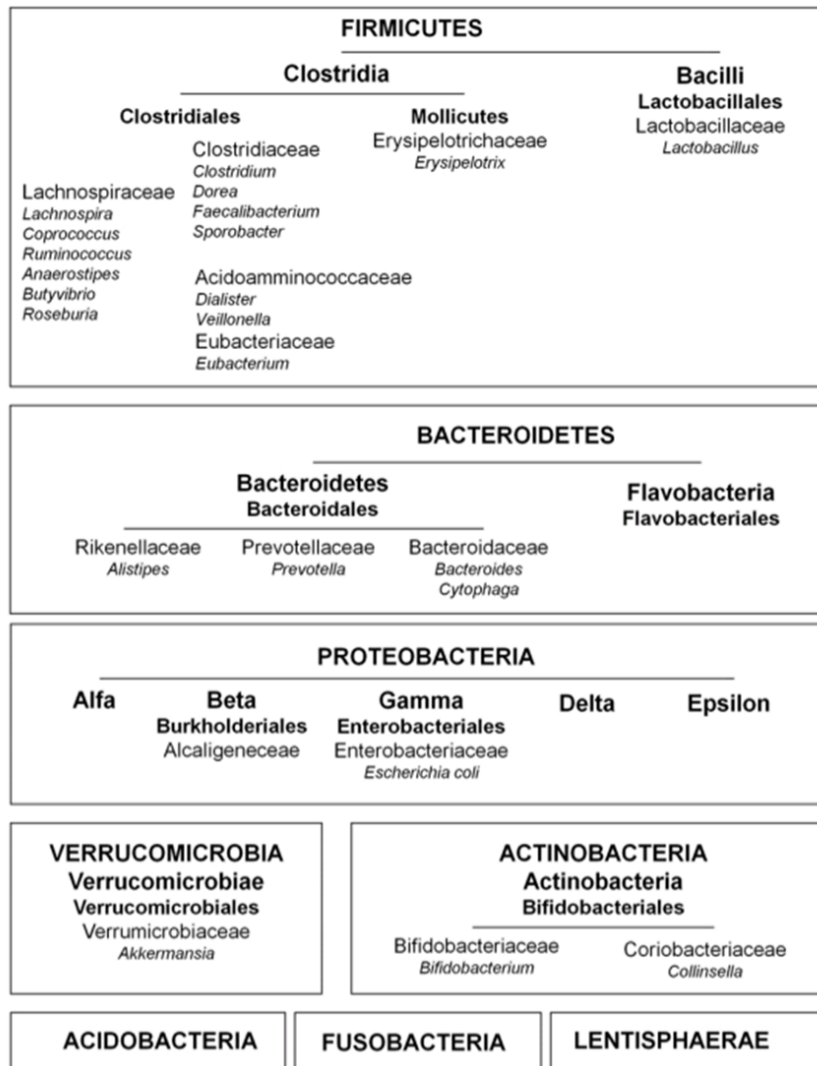


Figura 3. Composição da microbiota residente intestinal humana. Adaptado de Tagliabue e Elli, 2012.

Já foi demonstrado, que animais germ-free apresentam peso corporal 40% menor quando comparados aos animais controle (Rabot et al., 2010) e diferentes mecanismos parecem estar envolvidos nessa interação. O aumento da extração de energia de compostos não digeríveis (fibras alimentares), que acabam sendo fermentados em ácidos graxos de cadeia curta (Bäckhed et al., 2004) e a capacidade da microbiota intestinal de suprimir a oxidação de ácidos graxos no fígado e no músculo esquelético (Bäckhed et al., 2007) podem contribuir para o surgimento da obesidade. Turnbaugh et al, 2006 realizaram um dos primeiros estudos que associaram definitivamente a microbiota intestinal ao ganho de peso, causado por um aumento na capacidade de captação de energia da microbiota 'obesa' (Figura 2). O microbioma intestinal possui enzimas hidrolases de glicosídeos,

não encontradas no genoma humano e que estão envolvidas na hidrólise e fermentação de uma ampla variedade de polissacarídeos dietéticos que aumentam a extração de energia do hospedeiro (Xu et al, 2003; Sonnenburg et al. 2005). Além disso, camundongos germ free colonizados com 'microbiota-obesa' isolada de camundongos geneticamente obesos apresentaram maior percentual de aumento de gordura corporal do que aqueles colonizados com 'microbiota-magra', apesar de não demonstrarem diferenças significativas no consumo de alimentos (Tumbaugh et al, 2006).

Além disso, alguns estudos sugerem que o processo inflamatório associado à obesidade pode ser iniciado pelos níveis plasmáticos de LPS, modulados por bactérias intestinais (Cani et al., 2007). Assim, alterações na composição da microbiota intestinal acabam por promover uma alteração na barreira das mucosas, aumentando a permeabilidade intestinal e levando ao aumento do LPS circulante (Cani & Delzenne, 2011). Assim, a endotoxemia metabólica associada a este microbioma parece representar uma das ligações mais importantes entre a microbiota intestinal, a permeabilidade intestinal e o estado inflamatório associado à obesidade.

Portanto, atualmente já reconhecemos que a microbiota gastrointestinal mantém uma relação complexa e recíproca com o sistema imune do hospedeiro (Hooper et al, 2012; Jarchum et al, 2011; Maynard et al, 2012). Essa relação pode se dar devido ao aumento da resposta imune inata e ao controle da inflamação, principalmente pelas vias reguladas por receptor Toll-like (TLR). Esses eventos acabam por gerar alterações imunológicas e hormonais, alterando a fisiologia do indivíduo (Almeida et al, 2009). Assim, hábitos de vida que afetam o equilíbrio da microbiota, como dieta, estresse e o uso de antibióticos, por exemplo, levam ao desequilíbrio da microbiota residente. Este estado transitório da microbiota, com composição e funções diferentes, acaba por prevalecer sobre o residente, aumentando a suscetibilidade a distúrbios gastrointestinais (Spezia et al, 2012).

Além disso, diferenças na composição da microbiota e em sua potencial função já foram identificadas em indivíduos com diferentes níveis de doenças quando comparado com indivíduos saudáveis, incluindo doenças inflamatórias intestinais, artrite, diabetes tipo 2 e asma (Penders et al, 2007; Herbert et al, 2009).

### 1.3 Tuberculose

Um aspecto da infecção por *M. tuberculosis* que permanece inexplorado é o papel da microbiota residente no desenvolvimento da Tuberculose (TB). Estudos recentes em animais obesos mostraram uma diminuição na resistência às infecções causadas por bactérias como *Mycobacterium abscessus* (Ordway et al, 2008) *Klebsiella pneumonia* (Mancuso et al, 2002), *Streptococcus pneumonia* (Hsu et al, 2007) e *Mycobacterium tuberculosis* (Wieland et al, 2005), como também em infecções causadas por vírus (Milner and Beck, 2012).

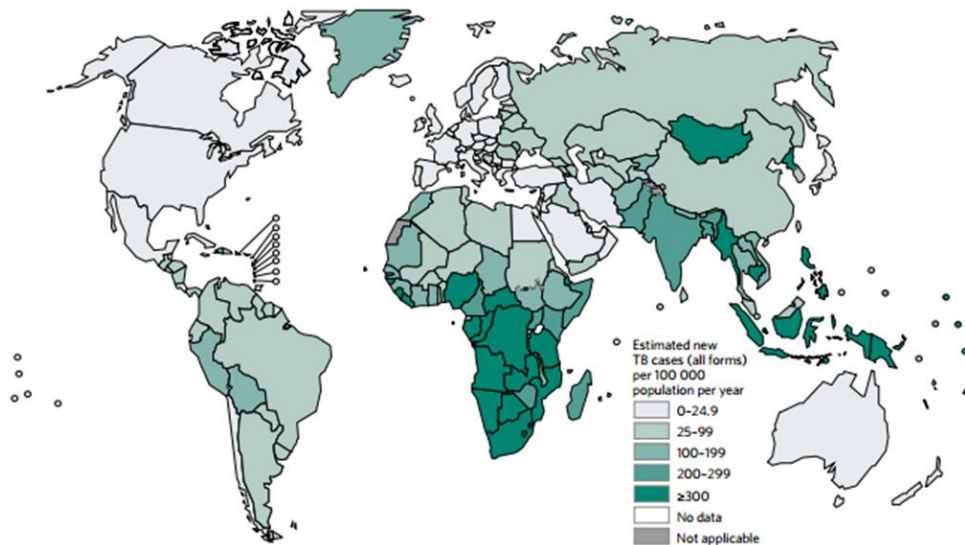
Em pacientes com infecção tuberculosa latente, observou-se que aqueles que eventualmente evoluíram para tuberculose ativa eram cerca de 50% menos propensos a serem colonizados por *H. pylori*, reforçando o papel imunomodulador da microbiota (Perry et al, 2010). Em um diferente estudo, também foi relacionado que a colonização da microbiota intestinal por *H. hepaticus* impactou drasticamente o controle do sistema imune, aumentando a lesão tecidual pulmonar e intensificando a imunopatologia associada a TB (Majlessi et al, 2017). Ainda de acordo com Majlessi (2017), este resultado está associado ao descontrole da imunidade inata, com um aumento da inflamação e acumulação de células T ativas no pulmão.

Já é conhecido que o uso de antibióticos altera a composição da microbiota, podendo impactar diretamente na saúde do hospedeiro (Dethlefsen et al, 2008; Jernberg et al, 2007). Deste modo, foi observado que camundongos C57/BL6, tratados com antibióticos antes ou depois da infecção por *M. tuberculosis*, apresentaram alta suscetibilidade no decorrer da doença (Khan et al, 2016). Além disso, quando os animais tratados com antibióticos receberam transplante fecal de animais controle, sua microbiota intestinal foi reestabelecida, e de maneira interessante, a carga pulmonar de *M. tuberculosis* foi diminuída (Khan et al, 2016).

A Tuberculose continua sendo um grande problema de saúde global, sendo responsável por comprometer a saúde de milhões de pessoas a cada ano. É uma doença de epidemia global (Figura 4), considerada a segunda principal causa de morte por doença infecciosa em todo o mundo, atrás apenas do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Atualmente não existem muitos métodos preventivos eficientes em reduzir o crescimento do número de pessoas infectadas, sendo a vacina Bacille-Calmette-Guérin (BCG) o método terapêutico mais eficiente de controlar a tuberculose em crianças, porém é observado que a vacina falha em

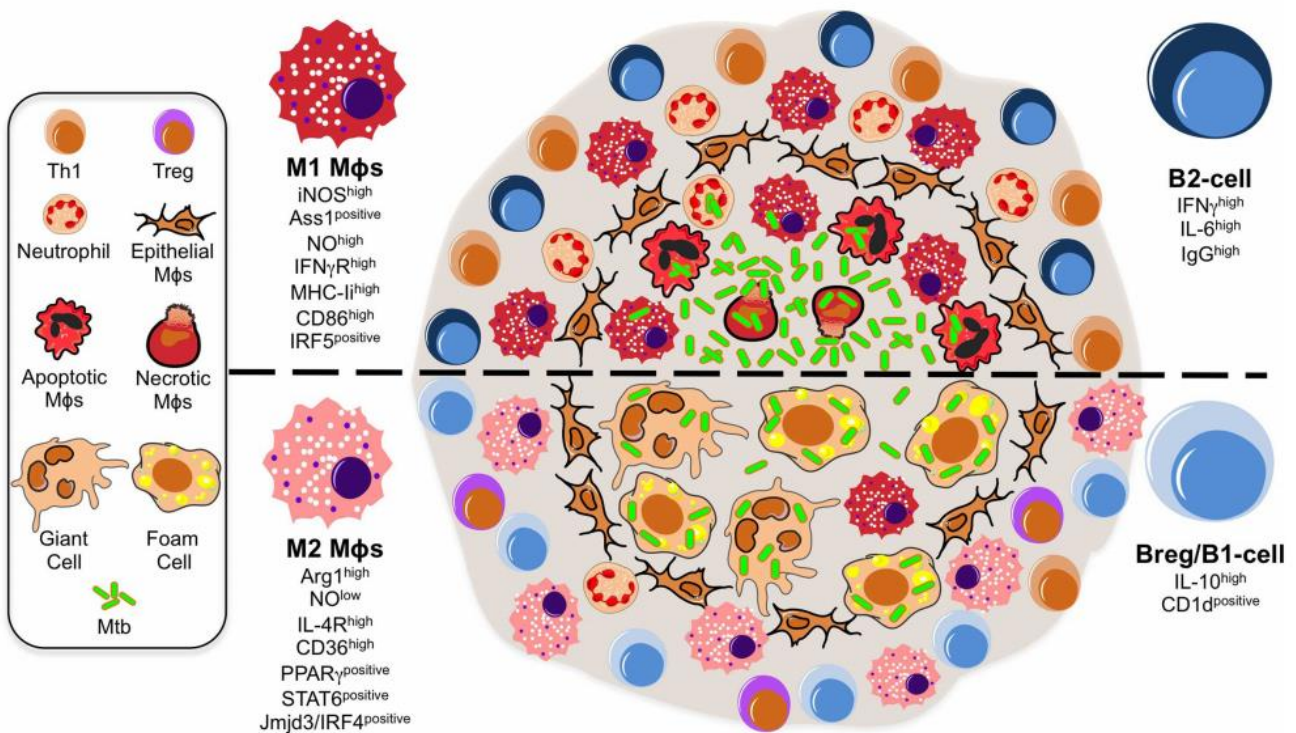


conter a infecção em indivíduos adultos, o que torna necessária a investigação de novos alvos terapêuticos para o controle da doença.



**Figura 4. Estimativa de novos casos de Tuberculose ao redor do mundo.** Adaptado de GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2016, Organização Mundial da Saúde.

Durante o processo infeccioso da Tuberculose, ocorre a formação de granulomas, que são caracterizados por um grande número de macrófagos infectados rodeados por outras células do sistema imune como linfócitos, monócitos e células epiteliais (Figura 5). Os macrófagos alveolares presentes no pulmão são os primeiros tipos celulares envolvidos na resposta contra a micobactéria (Nguyen and Pieters, 2005). A diferenciação de macrófagos em células “espumosas” durante a infecção intracelular induzida por micobactérias patogênicas é uma observação patológica comum em granulomas formados tanto em condições clínicas quanto experimentais da tuberculose, onde o aspecto espumoso é refletido pelo acúmulo intracelular de lipídeos ou corpúsculos lipídicos (D’Avila et al, 2006; Peyron et al, 2008). No entanto o significado funcional destas células ainda é pouco entendido.



**Figura 5. Granuloma tuberculoso.** Adaptado de Lugo-Villarino et al, 2013.

Os macrófagos reconhecem e interagem com as micobactérias por diversos receptores. Toll-like 2 (TLR2) consegue reconhecer componentes micobacterianos como lipoarabinomannan (LAM), lipomannan, fosfatidilinositol mannosides (PIMs), lipoproteína de 19 kDa e trealose dimicolato (TDM) (Bowdish et al., 2009; Jones et al., 2001; Means et al., 1999; Quesniaux et al., 2004). Além disso, a deficiência em outros receptores Toll, como TLR9 e na molécula adaptadora MyD88 se provou mais suscetível à infecção (Bafica et al., 2005; Fremond et al., 2004; Ryffel et al., 2005).

Uma vez dentro do macrófago, a micobactéria reside em um fagossoma. Já é descrito que a micobactéria modifica a maturação deste compartimento fagossomal, bloqueando a fusão lisossomal e a acidificação (Armstrong & Hart, 1975). Além disso, a micobactéria também impede a associação do fagossoma com a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Miller et al., 2004) a fim de assegurar sua sobrevivência dentro da célula. A associação com a iNOS culminaria na produção de óxido nítrico (NO), um produto altamente tóxico para a micobactéria (Chan et al., 1992).

Com a internalização da micobactéria, os macrófagos agora são estimulados a secretar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12

(Brightbill et al., 1999; Means et al., 1999), e essas citocinas vem a apresentar importantes ações no curso da infecção.

O TNF- $\alpha$  estimula, de forma autócrina e paracrina, neutrófilos e macrófagos a entrarem em apoptose e a produzirem ROI/RNI para destruir os bacilos fagocitados (Gan et al., 2005). Além disso, o TNF- $\alpha$  também pode contribuir na formação do granuloma, muito devido a sua capacidade de recrutamento de leucócitos (Algood et al., 2004). A IL-1 estimula macrófagos a produzirem mais TNF- $\alpha$  e IL-6 e ainda regula positivamente a expressão de células T (Toossi et al., 1990). Em contraste, a IL-6 inibe a transcrição *in vitro* de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , aumentando o crescimento micobacteriano tanto intra quanto extracelular (Denis & Gregg, 1991). Além disso, a IL-6 também suprime a proliferação de células T e a produção de IL-2 (VanHeyningen et al., 1997). Já a IL-12, atua fortemente no controle dos bacilos micobacterianos, tanto na estimulação da diferenciação de células Th1 e produção de IFN- $\gamma$  (Cooper et al., 1995), quanto na estimulação de células T citotóxicas e células NK (Bertagnolli et al., 1992). Além disso, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , que suprimem as respostas de Th1, tendem a ser expressas em pacientes com tuberculose (Hirsch et al., 1996). Em adição, um maior número de células T regulatórias já foi observado no sangue periférico de pacientes infectados (Guyot-Revol et al., 2006).

Além dessas citocinas de destaque na infecção, também temos o IFN- $\gamma$  que ativa macrófagos e os estimulam a produzirem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, provavelmente sendo a citocina mais importante na resposta imune frente à micobactéria. O IFN- $\gamma$  é produzido principalmente por linfócitos Th1 e CD8+ citotóxico, células NK e NKT, células apresentadoras profissionais (APCs) e, em menor importância células B (Martinez et al., 2009). Camundongos com deficiência em IFN- $\gamma$  ou em seu receptor são extremamente suscetíveis à infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG, com alto índice de morte e formação progressiva de granulomas destrutivos (Flynn et al., 1993; Kamijo et al., 1993). A alta suscetibilidade à infecção micobacteriana enfrentada por pacientes com AIDS, muito provavelmente se dá pela falha na produção de níveis elevados de IFN- $\gamma$  (Law et al., 1996).

Além dos macrófagos, os neutrófilos apresentam grande importância no curso da infecção. Este tipo celular é predominantemente infectado por micobactérias, sugerindo que eles apresentam um ambiente permissivo ideal para a replicação micobacteriana (Eum et al., 2010). Além disso, eles possuem importantes

funções na produção de citocinas e quimiocinas, na formação do granuloma e na transferência de moléculas microbidas para macrófagos vizinhos e infectados (Riedel & Kaufmann, 1997; Seiler et al., 2003; Tan et al., 2006). No entanto, a capacidade dos neutrófilos de eliminar diretamente as micobactérias é controversa (Denis, 1991; Jones et al., 1990).

A alteração no metabolismo lipídico de células hospedeiras infectadas por patógenos intracelulares está emergindo como um elemento chave na patogênese da infecção por micobactérias. As micobactérias patogênicas dependem largamente dos lipídeos oriundos das células hospedeiras para a sua sobrevivência e crescimento. Várias evidências sugerem que a modulação do metabolismo lipídico do hospedeiro por micobactérias induz a formação dos corpúsculos lipídicos com importante destaque na tuberculose (D'Avila et al, 2006; Peyron et al, 2008; Almeida et al, 2009; Almeida et al. 2014) e na hanseníase (Mattos et al, 2010; Mattos et al, 2014).

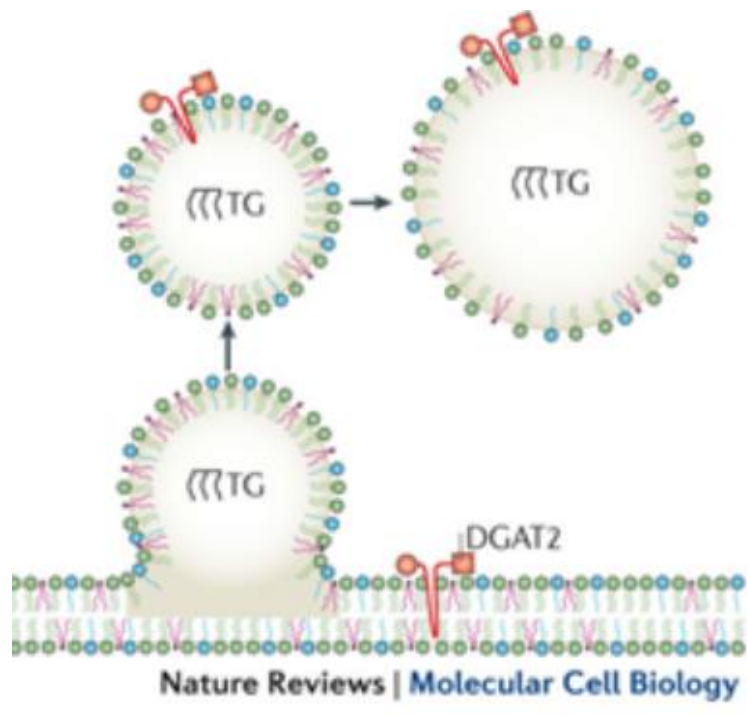
#### **1.4 Corpúsculos lipídicos**

Os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas e funcionalmente ativas, que funcionam como sítios de sinalização em leucócitos contribuindo para a regulação do metabolismo lipídico, o tráfego de membranas, a sinalização intracelular e a síntese de mediadores inflamatórios (Bozza et al, 2007). Eles se distribuem pelo citoplasma da maioria das células, sendo estruturas esféricas, compostas de lipídios neutros, como triacilglicerol e colesterol-éster, e delimitadas por uma monocamada fosfolipídica com proteínas associadas. Tal conformação difere os corpúsculos lipídicos das outras organelas, que apresentam conteúdo aquoso e são delimitadas por uma bicamada fosfolipídica (Bozza et al. 2007). Em análise morfológica, os corpúsculos lipídicos, apresentam elétrons de densidade variável e alguns apresentam uma área elétrica lúcida no centro (Melo et al., 2003).

Os corpúsculos lipídicos apresentam um conteúdo proteico característico – como as proteínas da família PAT. Estas proteínas são as perilipinas, as proteínas relacionadas à diferenciação de adipócitos (ADRP) e a proteína de interação de porção terminal de 47 kilodaltons (TIP47), também chamadas de PLIN 1, PLIN 2 e PLIN 3, respectivamente, todas encontradas na monocamada lipídica e que atuam diretamente na estocagem e no metabolismo lipídico (Brasaemle et al, 2004; Wollins

et al, 2001). Também apresentam uma variedade de outras proteínas, como as GTPases da família RAB, consideradas reguladoras chave do tráfego vesicular e da interação entre organelas (Brasaenle et al, 2004).

A teoria mais aceita acerca da biogênese do corpúsculo lipídico se dá a partir do Reticulo Endoplasmático (RE), onde ocorre uma acumulação de lipídios neutros entre as membranas dos folhetos citoplasmático e luminal do RE, seguido de um brotamento do corpúsculo envolto em monocamada fosfolipídica proveniente do folheto citoplasmático (Figura 6) (Murphy, 2001). Quando formados, os corpúsculos lipídicos são suscetíveis a aumentar seu volume, tanto por síntese localizada de lipídios (Kuerschner et al, 2008) como por fusão de corpúsculos (Olofsson et al, 2009).

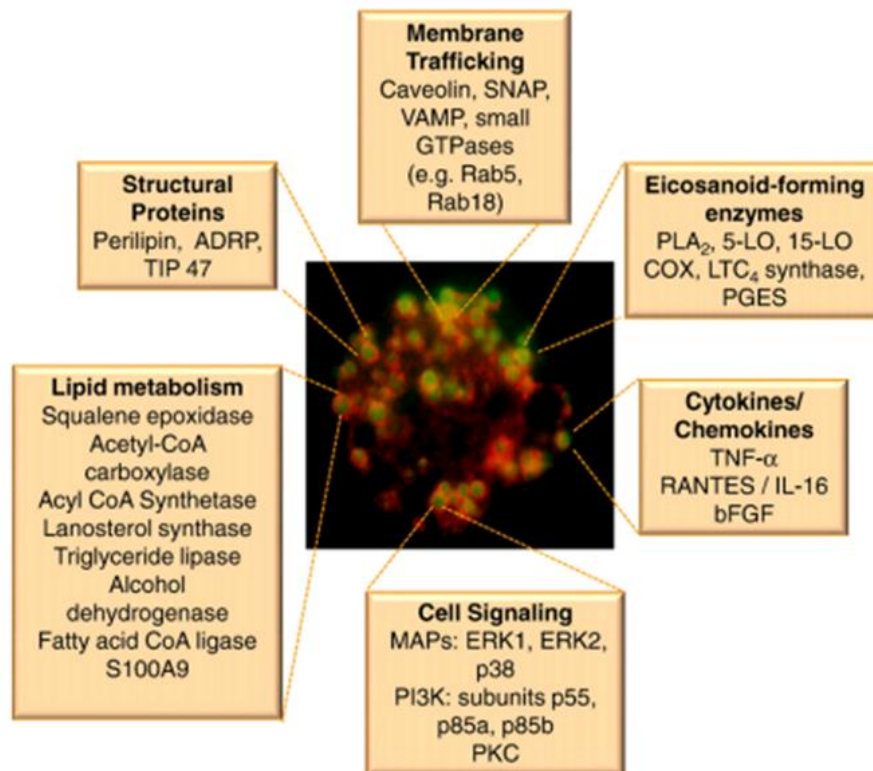


**Figura 6. Formação do corpúsculo lipídico.** Adaptado de Thiam et al. 2013.

Leucócitos em repouso apresentam poucos corpúsculos lipídicos, porém essas células podem sofrer estímulos e rapidamente estimular a formação de muitos novos corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 2007). O aumento dos corpúsculos lipídicos dentro dessas células tem sido observado em conjunto com doenças infecciosas e na inflamação clínica e experimental, incluindo macrófagos em lesões de aterosclerose (Paul et al, 2008), eosinófilos em processos alérgicos (Vieira-de-Abreu et al, 2010), células cancerígenas (Accioly et al, 2008) e em macrófagos de

infecção micobacteriana (D'Avila et al, 2006; Almeida et al, 2009; Matos et al, 2011; Almeida et al, 2014).

O aumento de corpúsculos lipídicos nesses leucócitos leva a um aumento da produção de eicosanoides (Bozza and Bandeira-Melo, 2005) e trabalhos anteriores já demonstraram que dentro dessas organelas há presença de ciclooxigenase (COX), prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), 5- e 15-lipoxigenase (5-LO e 15-LO) e leucotrieno C4 (LTC<sub>4</sub>), todas precursoras de eicosanoides (Figura 7) (Bozza et al, 2007). Além disso, nos macrófagos espumosos, provenientes de lesões desencadeadas na TB, foram encontrados altos níveis de COX-2 e PGE2 (Rangel-Moreno et al, 2002).



**Figura 7. Diferentes marcações e funções em corpúsculos lipídicos.** Adaptado de Bozza et al. 2009.

Diferentes vias de sinalização parecem levar a formação do CL dentro dos leucócitos. *M. bovis* BCG induz a formação de corpúsculo lipídico mediante receptor Toll-like 2 (TLR-2) (D'Avila et al, 2006) e CD36 (Almeida et al, 2009; Almeida et al, 2014). A formação do corpúsculo lipídico envolve mecanismos translacionais e transcricionais específicos, como o controle translacional do caminho de ativação do Alvo da Rapamicina em mamíferos (mTOR) e fatores transcricionais como o Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxisomos Gamma (PPAR $\gamma$ ).

A ação conjunta entre CD36-TLR2, em associação com CD11b e CD14, compartimentalizados em “lipid-rafts” induz o sinal de resposta do hospedeiro, com aumento da expressão e ativação de PPAR $\gamma$ , através de caminhos independentes de NF $\kappa$ B, levando ao aumento do acúmulo de lipídios em macrófagos e modulação da resposta imune (Almeida et al. 2014). O aspecto espumoso refletido pelos corpúsculos lipídicos também é desencadeado por *M. leprae*, como uma estratégia eficaz para adquirir lipídios para si e modular a resposta imune a fim de favorecer a sua sobrevivência (Mattos et al., 2011).

Em contrapartida, a ativação de macrófagos *in vitro* com *M. smegmatis*, ou Pam3CSK4, ambos potentes ligantes de TLR2, não conseguiu induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos. Isso sugere que apenas a ligação de TLR2 não é suficiente para essa resposta, e que provavelmente os co-receptores associados a TLR2 estão fortemente envolvidos no reconhecimento micobacteriano e na capacidade de resposta importantes para expressão de PPAR $\gamma$  e formação de corpúsculo lipídico (Almeida et al. 2014).

Assim, neste estudo nós utilizamos uma combinação de estratégias multidisciplinares com o uso de ferramentas de biologia celular e molecular, imunológicas e de microbiologia para ampliar os estudos e conhecimentos sobre a participação e função do perfil de obesidade durante a infecção por *M. bovis* BCG e como ela interfere e direciona o sistema imunológico e a microbiota intestinal.

O conhecimento destas interações mostra-se de grande interesse para a compreensão de mecanismos fundamentais envolvidos na interação parasita-hospedeiro, podendo contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos, bem como, fornece a base para o estabelecimento de estratégias que visem o melhor controle das infecções causadas por patógenos intracelulares e outras doenças infecciosas que são favorecidas pelo estado nutricional do hospedeiro e pelo papel modulador da microbiota residente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação e função da obesidade durante a infecção por *M. bovis* BCG e como ela interfere e direciona o sistema imunológico e a microbiota intestinal.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

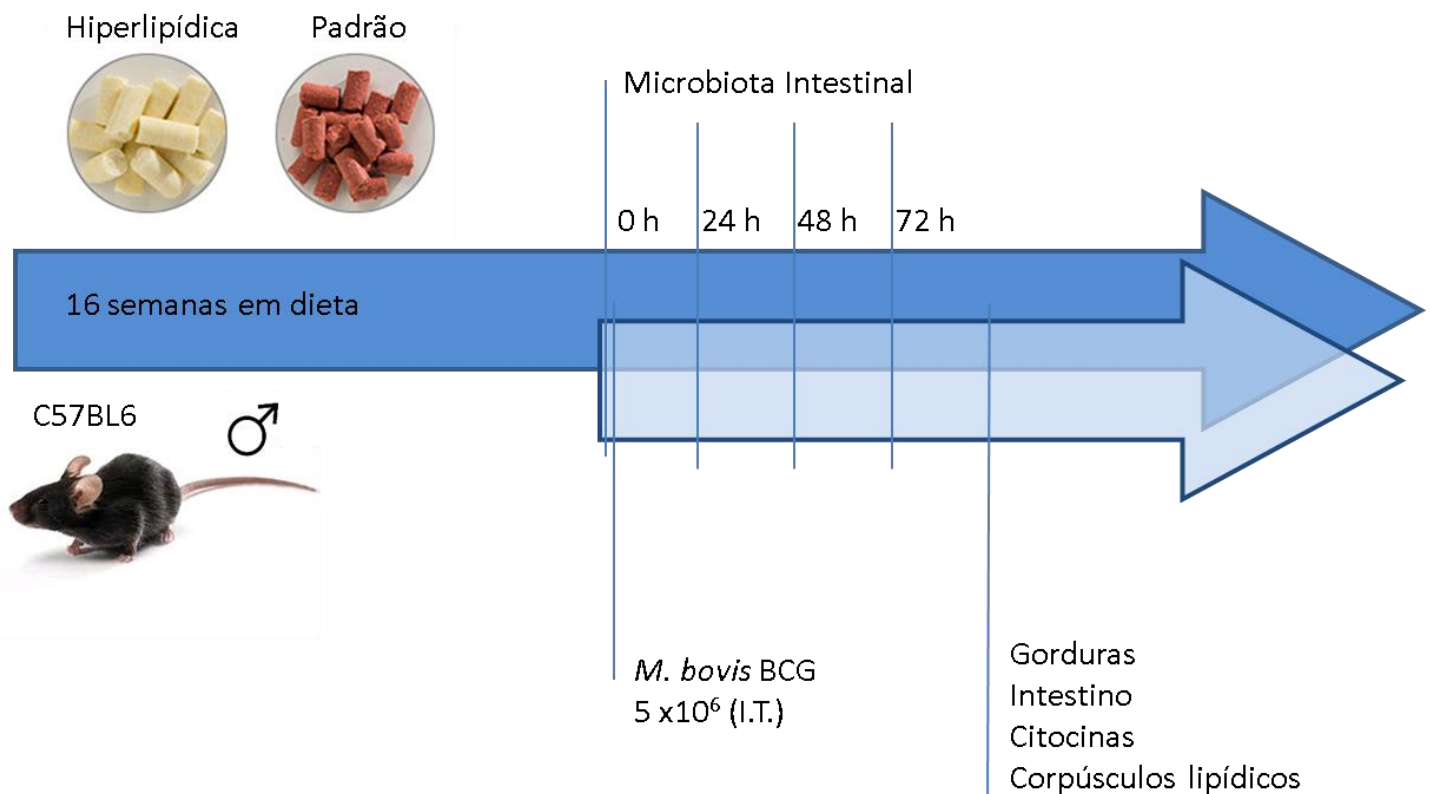
- (I) Indução da obesidade pelo modelo de dieta hiperlipídica;
- (II) Investigar se o perfil de obesidade modula os níveis de síntese e secreção de citocinas e quimiocinas de perfil pró-inflamatório (TNF- $\alpha$  e KC), de citocinas de perfil anti-inflamatório (IL-10) e adipocinas (adiponectina) em leucócitos pleurais de camundongos infectados ou não por *M. bovis* BCG;
- (III) Analisar se a formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos pleurais é afetada pela obesidade nos camundongos infectados ou não por *M. bovis* BCG;
- (IV) Avaliar o impacto da obesidade na indução de áreas de infiltrado inflamatório intestinal de camundongos infectados ou não por *M. bovis* BCG;
- (V) Avaliar o perfil estrutural da microbiota intestinal residente de camundongos obesos infectados ou não por *M. bovis* BCG;



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57/BL6, fornecidos pelo biotério do centro de biologia da reprodução (CBR) da UFJF. Os animais foram recebidos com idade entre 4 e 6 semanas e mantidos em uma sala no Biotério de experimentação animal do Laboratório de Biologia Celular, com temperatura de 22 a 24°C, com ciclos de 12h luz/escuro e livre oferta de água e comida. Os animais foram divididos entre os seguintes grupos: EUT/CT, EUT/BCG 24hrs, EUT/BCG 48hrs, EUT/BCG 72hrs, OB/CT, OB/BCG 24hrs, OB/BCG 48hrs e OB/BCG 72hrs. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética/UFJF Protocolo número 028/2016.



**Figura 8. Desenho experimental**

#### 3.2 Indução da obesidade

Camundongos C57/BL6 receberam ração hiperlipídica (Tabela 2) (Kennedy et al, 2009). A obesidade foi predita pelo cálculo do Índice de Lee (peso

corporal (g) <sup>1/3</sup>/ comprimento naso-anal (cm) x 1000) e, também, estimada pelo peso das gorduras retro-peritoneal (Andreazzi et al, 2009);

<b>Dieta Hiperlídica 35,2%</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>g</b>
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
<b>TOTAL</b>	<b>1000g</b>

**Tabela 2. Protocolo de preparo da ração hiperlipídica.**

### 3.3 *Mycobacterium bovis*, BCG

*Mycobacterium bovis*, BCG da cepa Moreau foram obtidas na forma de vacina liofilizada em ampolas de 40 mg contendo aproximadamente 200 x10<sup>6</sup> bacilos. Os bacilos foram diluídos em PBS estéril e ajustados na concentração de 5 x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) /ml. Na hora do uso os bacilos foram sonicados por 5 minutos e homogeneizados 10 vezes em agulha de insulina;

### 3.4 Análise da microbiota intestinal

Amostras fecais foram coletadas diariamente após a infecção para identificar a composição da estrutura microbiana intestinal. Foi formado um pool de cada grupo, contendo amostras de no mínimo 5 animais por grupo. As alíquotas foram congeladas a -80 °C até a realização da extração. O DNA foi extraído usando o kit QIAamp™ DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), com o auxílio da plataforma automatizada QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram realizadas análises por rep-PCR usando o DNA extraído das amostras. As reações foram realizadas usando um único oligoiniciador

(GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). O volume das reações de PCR foram de 25 µL, contendo 12,5 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µL de DNA (~20 ng/µL), 20 pMol de oligoiniciador e o volume completado com água.

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 2,5 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 2 horas a 100 volts. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, Reino Unido). Foi utilizado o padrão de peso molecular 100pb DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA).

### 3.5 Pleurisia induzida por BCG

Os animais foram infectados intratoracicamente (IT) com BCG ( $5 \times 10^6$  bacilo/cavidade) em 100 µL salina estéril. Os animais controles receberam volume igual a 100 µL de salina estéril. Após a infecção por BCG os animais foram mantidos por 24 ou 48 ou 72 horas e então eutanasiados por inalação em câmara de CO<sub>2</sub> seguido por ruptura do diafragma. Os animais continuaram com dieta, ingestão de água e comportamento idêntico aos animais controle que não receberam a injeção por BCG. Posteriormente a cavidade pleural foi lavada com 1 mL de PBS estéril para obtenção da suspensão celular;

### 3.6 Aquisição de material biológico

Após a eutanásia os animais tiveram suas cavidades peritoneais abertas e o tecido adiposo retro-peritoneal e perigonadal foram coletados com auxílio de tesoura e pinça, pesados e congelados a -80°C; A porção final do intestino também foi coletada e fixada em PFA 4% para análise histológica.

### 3.7 Histologia do Intestino

O processamento foi realizado com o auxílio de um processador automático Lupetec, modelo PT 05, onde 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 por fim, Parafina a 60°C I e II (por 90 minutos cada um). Após isso, os tecidos foram incluídos no interior de um molde que já continha parafina líquida com a superfície a ser seccionada para baixo. Por fim, os blocos foram cortados com espessura de 5 µm no micrótomo Lupetec, modelo rotativo, e a fita foi colocada em banho-maria, por volta de 40°C, para que os cortes se distendessem sobre a superfície da água. Os cortes foram coletados com um lamina limpa e transportados para uma placa aquecedora. Para melhorar a adesão do corte e retirar o excesso de parafina, as laminas foram deixadas em estufa aquecida à 60°C por no mínimo 2 horas.

Para a coloração as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas até a água destilada por 3 minutos em cada banho. Foram coradas com 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) durante 20 minutos, lavadas em água corrente por 25 minutos, desidratadas com álcool 70% durante 3 minutos, coradas pela Eosina-Floxina durante 2 minutos e rapidamente lavadas em álcool 95%. Por fim foram desidratadas em 3 banhos de álcool absoluto por 3 minutos cada e clarificadas em 3 banhos de xilol também por 3 minutos. As laminas foram montadas com meio de montagem Goma de Damar.

### 3.8 Contagem total de células

Após a coleta do lavado pleural, uma alíquota de 10 µl foi retirada 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;

### 3.9 Contagem de corpúsculos lipídicos

Alíquotas do lavado pleural foram retiradas e citocentrifugadas para a obtenção de lâminas que posteriormente foram fixadas em formalina 3,7%. As lâminas foram coradas com Oil-Red-O e montadas com meio de montagem Vectashield com DAPI. A quantificação dos corpúsculos lipídicos se deu por contagem de 50 células consecutivas em microscópio de fluorescência Olympus DP73 com aumento de 1000X, auxiliada pelo programa CellSens Dimension;

### 3.10 Dosagem de citocinas

A concentração das quimiocinas e citocinas KC (homóloga a IL-8 humana), IL-10 e TNF- $\alpha$  e da adipocina (adiponectina) no lavado pleural foi determinada por ELISA 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  $\pm$  EPM.

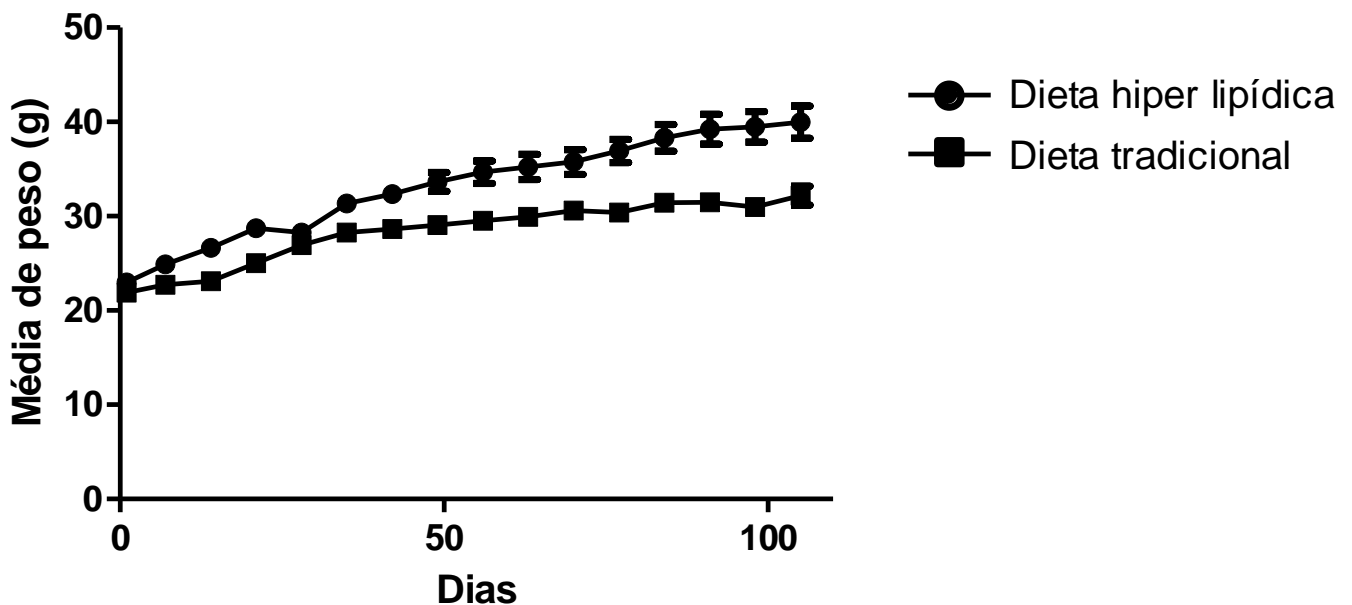
### 3.11 Análise Estatística

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

## 4 RESULTADOS

### 4.1 A dieta hiperlipídica foi capaz de induzir um quadro de obesidade

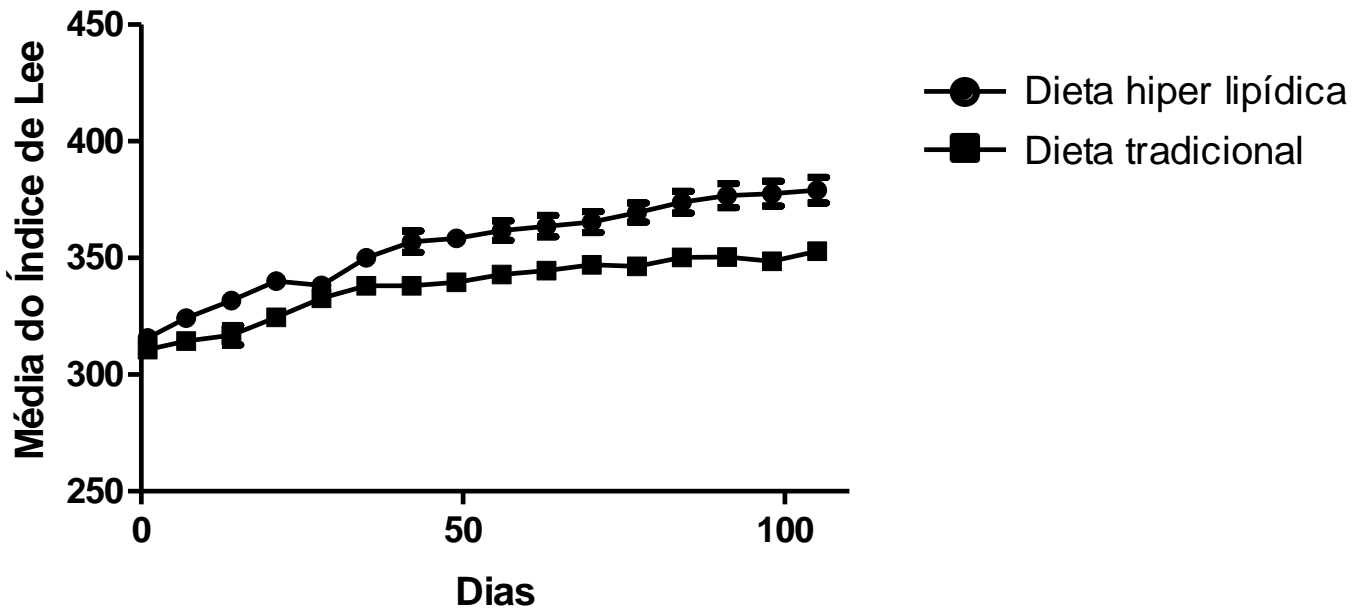
Para a indução da obesidade, foi utilizada dieta hiperlipídica, conforme a Tabela 1. Os animais foram pesados uma vez por semana, durante 16 semanas, e a média de peso foi registrada (Figura 9).



**Figura 9. Peso médio dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.**

Os animais foram pesados uma vez por semana até completarem as 16 semanas do protocolo de indução de obesidade. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5.

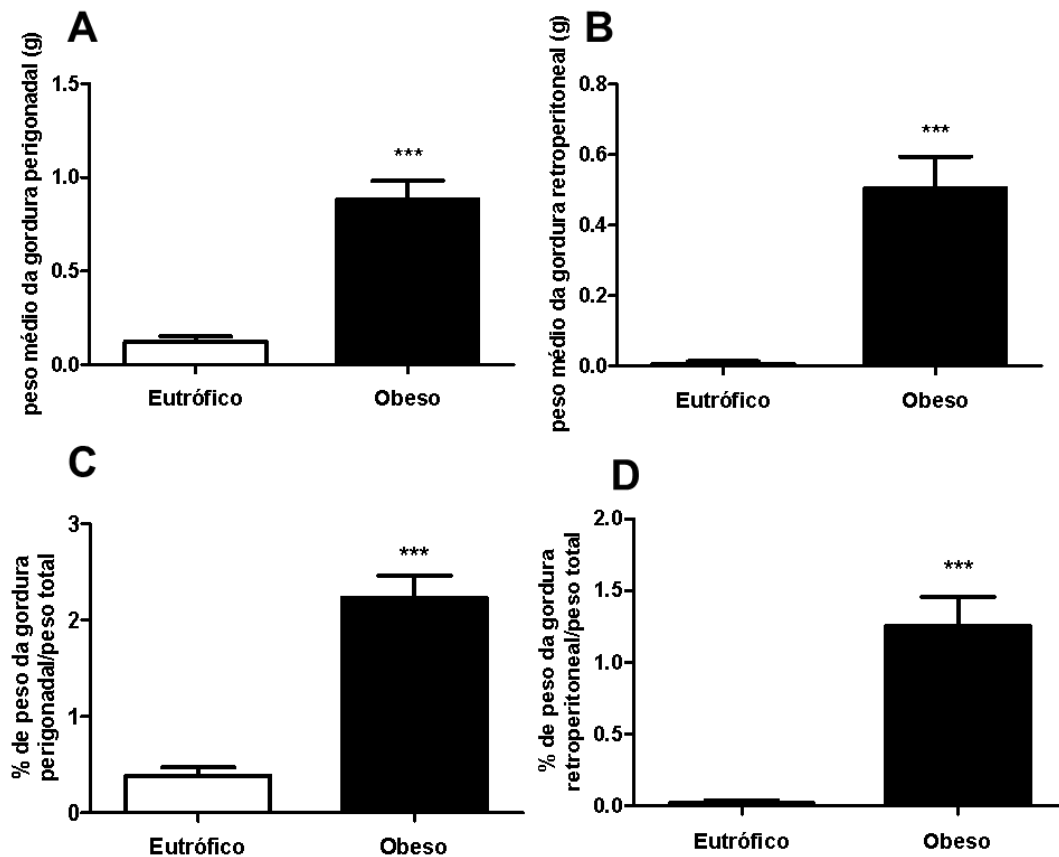
A Obesidade foi predita pelo índice de Lee, que consiste na divisão da raiz cúbica do peso do camundongo em gramas pelo comprimento nasoanal em centímetros e multiplicado por 1000. Assim, ao final de 16 semanas, conseguimos determinar que os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram quadro de obesidade quando comparados aos alimentados com dieta convencional (Figura 10).



**Figura 10. 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.

As gorduras perigonadal e retroperitoneal também foram retiradas dos camundongos e pesadas para comparação. Assim, conseguimos comparar o peso das gorduras dos camundongos obesos e eutróficos, e observamos um aumento significativo do peso das mesmas (Figura 11, A e B) e também da razão entre o peso das gorduras e o peso total do animal (Figura 11, C e D).

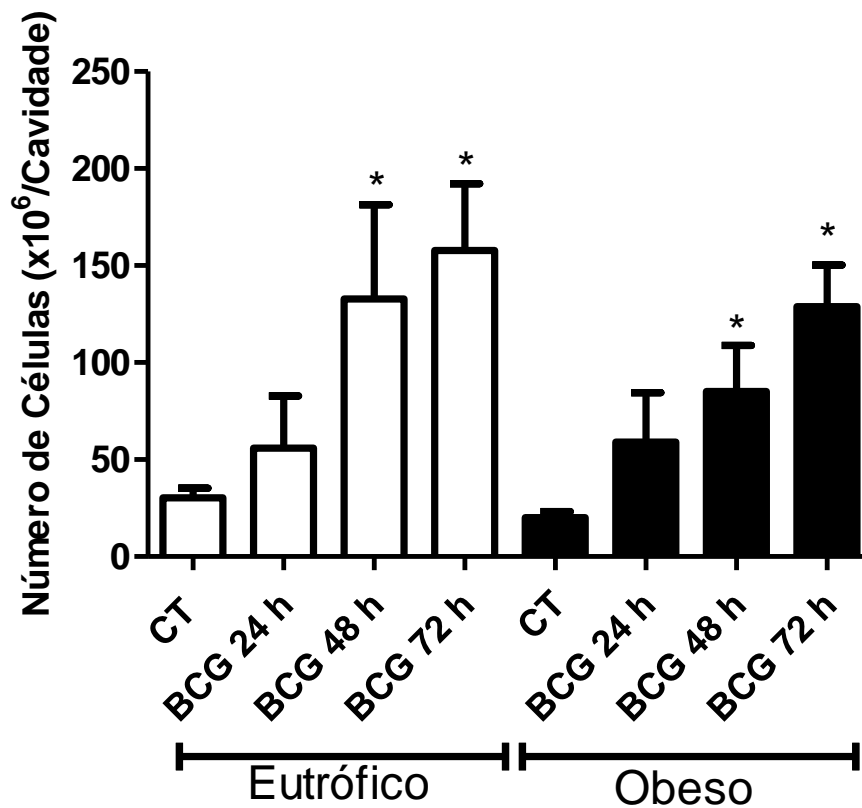


**Figura 11. Comparação entre as gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos eutróficos ou obesos.** (A) Peso médio da gordura perigonadal, (B) Peso médio da gordura retroperitoneal, (C) Porcentagem relativa entre o peso da gordura perigonadal e o peso total do animal e (D) Porcentagem relativa entre o peso da gordura retroperitoneal e o peso total do animal. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. A diferença significativa entre os obesos e seus respectivos controles eutróficos foi indicada por \* ( $p < 0,001$ ).

#### **4.2 A infecção por *M. bovis* BCG promoveu o aumento da migração leucocitária**

Para avaliarmos o sucesso da infecção por *M. bovis* BCG, foi realizado uma análise sobre a migração total de células para a cavidade. A contagem total de células nos permitiu observar um maior influxo de leucócitos para a cavidade pleural em ambos os grupos infectados, apresentando níveis significativos maiores que em relação a seus respectivos controles (Figura 12). Indicando assim o sucesso da infecção tanto nos animais eutróficos, como nos obesos.

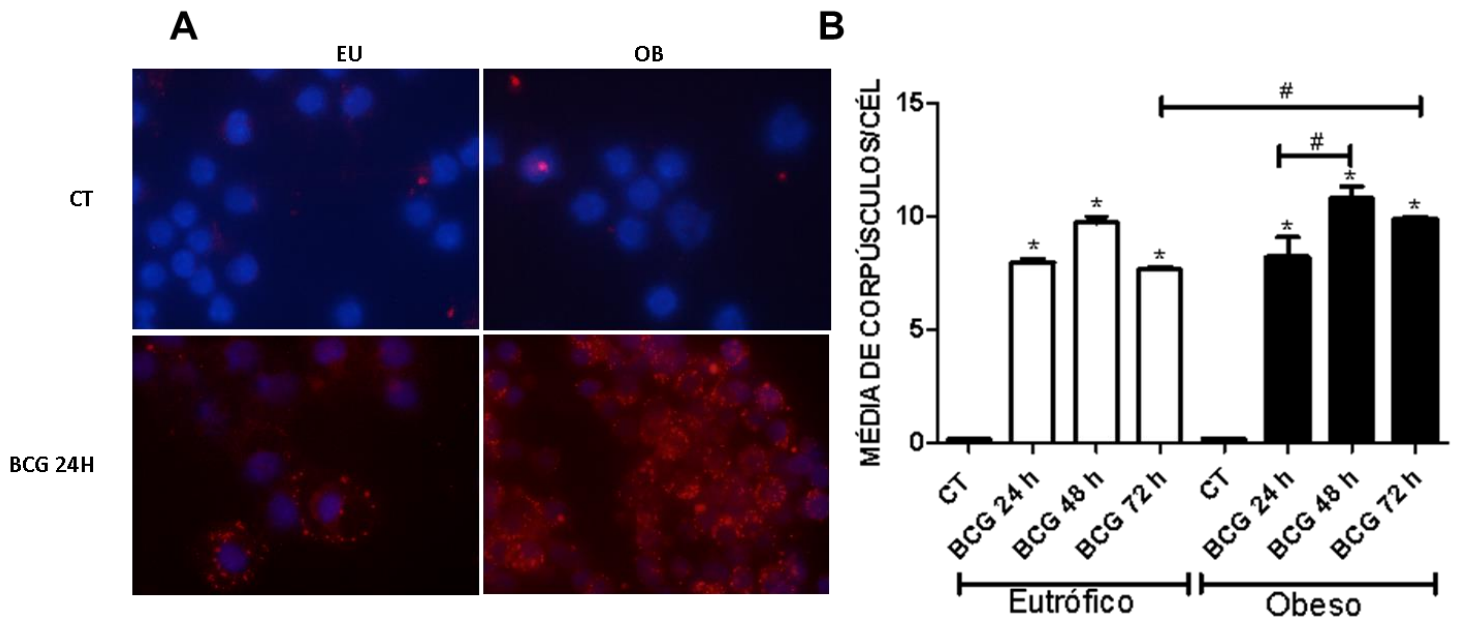




**Figura 12. Contagem total de células.** As células da suspensão foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio de campo claro. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. A diferença entre os grupos Eutróficos BCG 48h e 72h em relação a seu respectivo controle e ao grupo 24h foi indicada por \* ( $p < 0,005$ ). A diferença entre os grupos Obesos BCG 48h e BCG 72h em relação a seu respectivo controle foi indicada por # ( $p < 0,005$ ).

#### **4.3 Camundongos obesos com 72h de infecção apresentaram número de corpúsculos lipídicos maior quando comparados aos eutróficos**

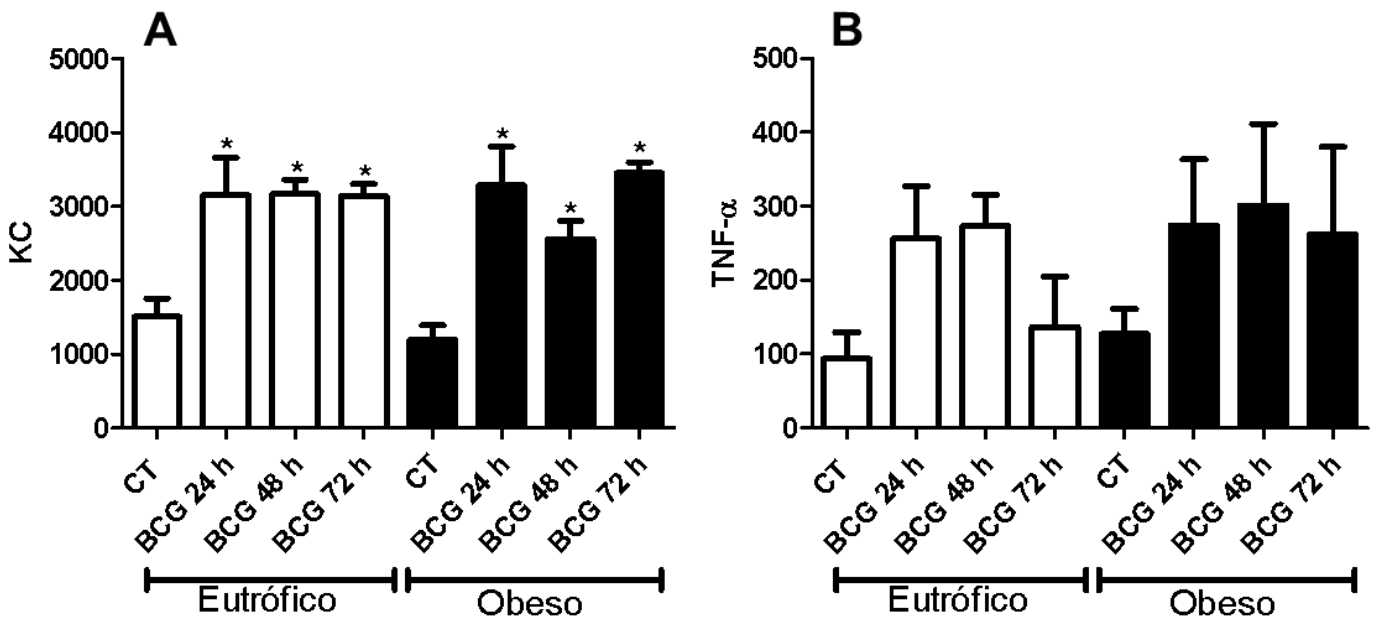
Para analisar o fenômeno da formação de corpúsculos lipídicos, lâminas confeccionadas a partir do lavado pleural, através de citospin, foram coradas com Oil-Red-O e montadas com DAPI. Nestas análises, foi possível observar que a infecção por *M. bovis* BCG aumenta de maneira significativa a formação de corpúsculos lipídicos tanto nos camundongos eutróficos, quanto nos obesos (Figura 13). Além disso, os camundongos obesos analisados no tempo de 72 horas pós-infecção apresentaram um aumento significativo do número de corpúsculos lipídicos quando comparados aos camundongos eutróficos com o mesmo tempo de infecção (Figura 13).



**Figura 13. Formação de corpúsculos lipídicos nas células do lavado pleural após 24, 48 ou 72 h de infecção por *M. bovis* BCG.** (A) Imagens dos corpúsculos lipídicos coradas com Oil Red O e núcleos corados com DAPI. (B) Gráfico da média de corpúsculos lipídicos por célula. Cada barra representa a média,  $\pm$  erro padrão de no mínimo 5 animais por grupo. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5. A diferença entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por \* ( $p < 0,005$ ). A diferença entre os grupos BCG 24h e BCG 48h obesos e entre os grupos BCG 72h eutrófico e BCG 72h obeso foi indicada por # ( $p < 0,005$ ).

#### **4.4 A síntese de KC e TNF- $\alpha$ foi aumentada pela infecção por *M. bovis* BCG**

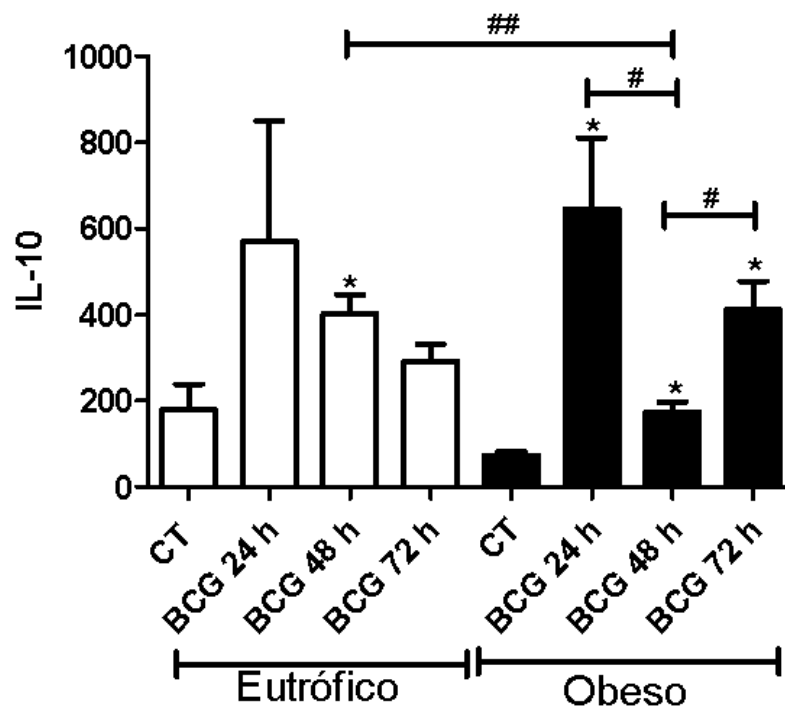
Para determinar a síntese de citocinas, foi utilizado o ensaio imunoenzimático de ELISA. Analisando a produção de KC, uma quimiocina atrativa de neutrófilos, homóloga a IL-8 humana, notamos que a infecção por *M. bovis* BCG aumentou seus níveis de síntese tanto nos camundongos eutróficos quanto obesos quando comparados a seus respectivos controles, e a obesidade pareceu não interferir em sua síntese (Figura 14, A). Em relação ao TNF- $\alpha$ , notamos que a infecção parece induzir um aumento em sua síntese em ambos grupos (Figura 14, B) e a obesidade pareceu não interferir em sua síntese.



**Figura 14.** Estudo da síntese de quimiocinas e citocinas de perfil pró-inflamatório produzidas por leucócitos pleurais infectados ou não por BCG após 24, 48 e 72 horas de infecção. Análise da síntese (A) KC, (B) TNF- $\alpha$  provenientes 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 \* ( $p < 0,005$ ).

#### **4.5 Foram observados menores níveis de IL-10 nos animais obesos com 48h de infecção quando comparados aos eutróficos**

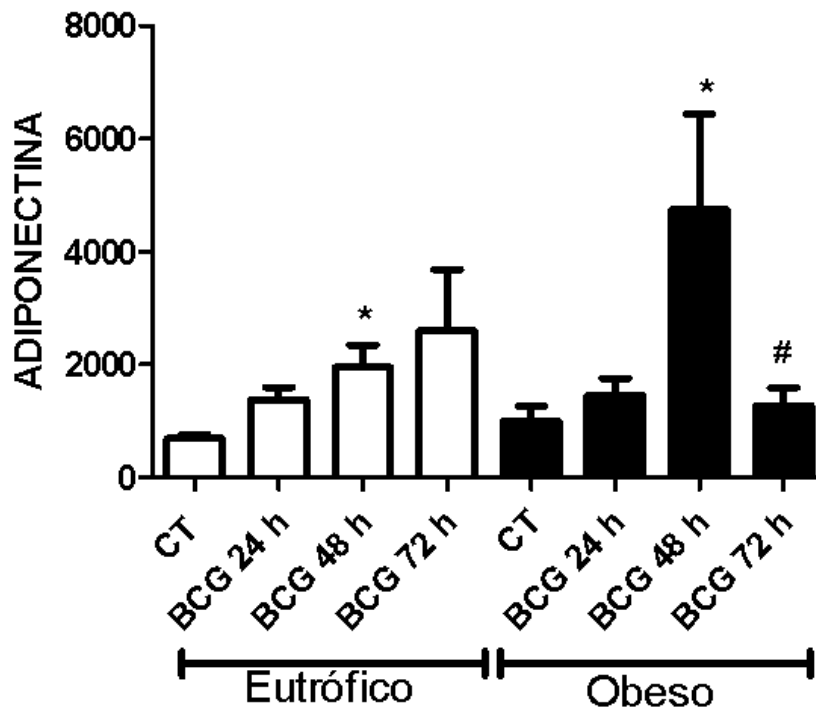
Quanto a IL-10, um citocina de perfil anti-inflamatório, percebemos que a infecção, na sua fase inicial, induz um aumento em sua síntese quando comparado ao controle (Figura 15). Nos camundongos eutróficos, a presença de IL-10 parece decair com o passar da infecção (Figura 15). Ao analisarmos as diferenças entre os camundongos eutróficos e obesos, foi possível observar que no tempo de 48 horas pós infecção os níveis de IL-10 foram significativamente menores nos obesos (Figura 15).



**Figura 15.** Estudo da síntese de IL-10, uma citocina de perfil anti-inflamatório produzida por leucócitos pleurais infectados ou não por BCG após 24, 48 e 72 horas de infecção. Análise da síntese IL-10 provenientes 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 BCG 48 h e Obeso BCG 48 h, entre os Obesos BCG 24h e 48h e entre os Obesos BCG 48h e 72h foi expressa por # ( $p < 0,005$ ).

#### **4.6 Camundongos obesos com 48h de infecção apresentam níveis elevados de adiponectina quando comparados aos eutróficos**

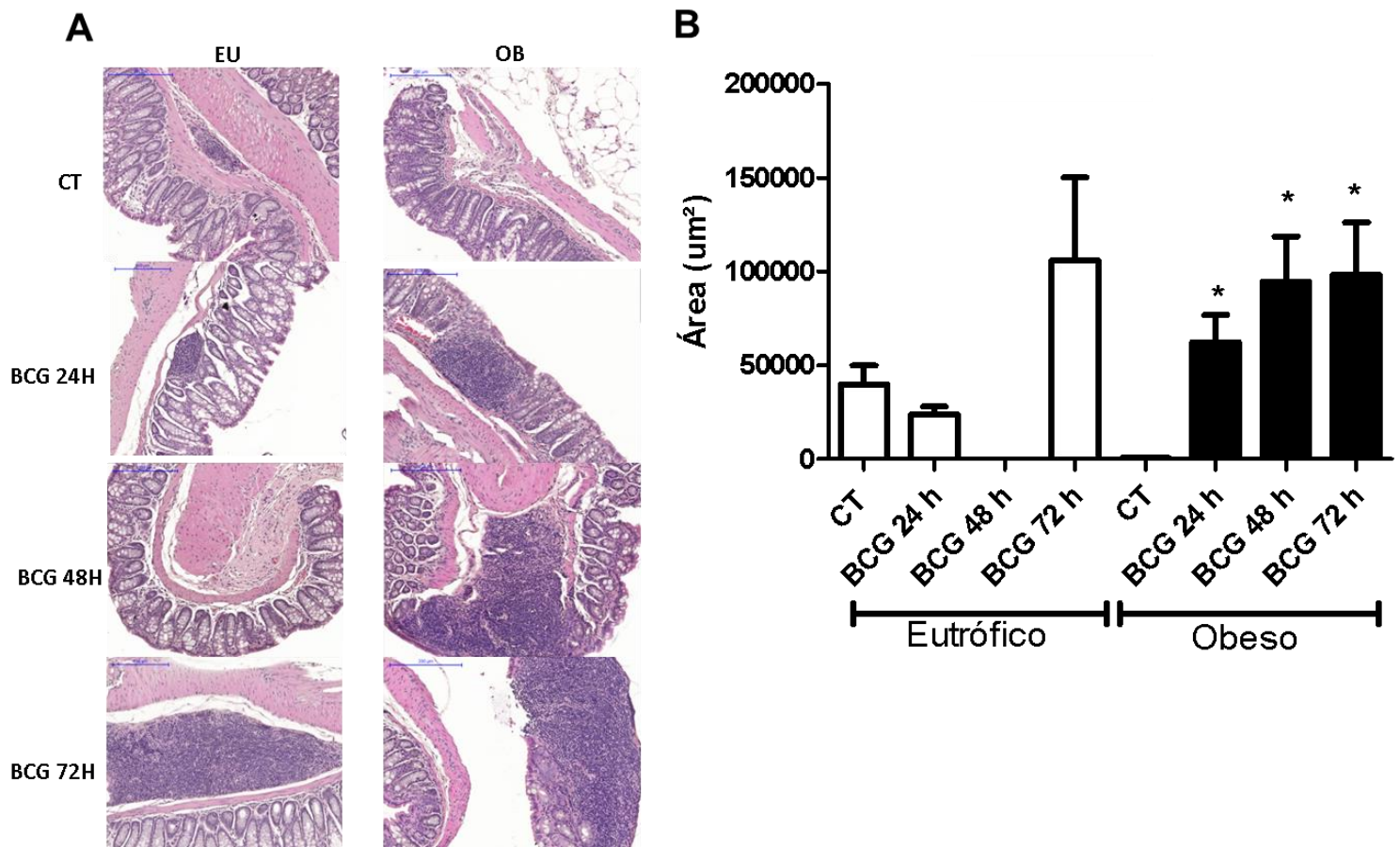
Sobre a síntese de adiponectina, uma adipocina relacionada á obesidade, conseguimos observar um aumento da presença nos animais obesos com 48h de infecção (Figura 15), além de observarmos um aparente aumento na presença de adiponectina no decorrer da infecção nos animais eutróficos (Figura 16).



**Figura 16. Estudo da síntese da adipocina adiponectina produzida por leucócitos pleurais infectados ou não por BCG após 24, 48 e 72 horas de infecção.** Análise da síntese de adiponectina proveniente 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 Obesos BCG 48h e 72h foi expressa por # ( $p < 0,005$ ).

#### **4.7 A infecção por *M. bovis* BCG leva ao aumento de infiltrados inflamatórios intestinais nos animais obesos**

Além disso, comparamos a histologia do intestino dos animais obesos e eutróficos, infectados ou não com *M. bovis* BCG (Figura 17). Assim, conseguimos notar que a infecção parece levar a um aumento de infiltrados inflamatórios no intestino. Podemos sugerir que o grupo dos obesos tende a desenvolver infiltrados inflamatórios ainda maiores do que os apresentados pelos eutróficos em todos os tempos de infecção analisados, além de apresentarem uma resposta inicial mais rápida. De forma surpreendente, não conseguimos identificar infiltrados inflamatórios nos animais eutróficos com 48 horas de infecção.

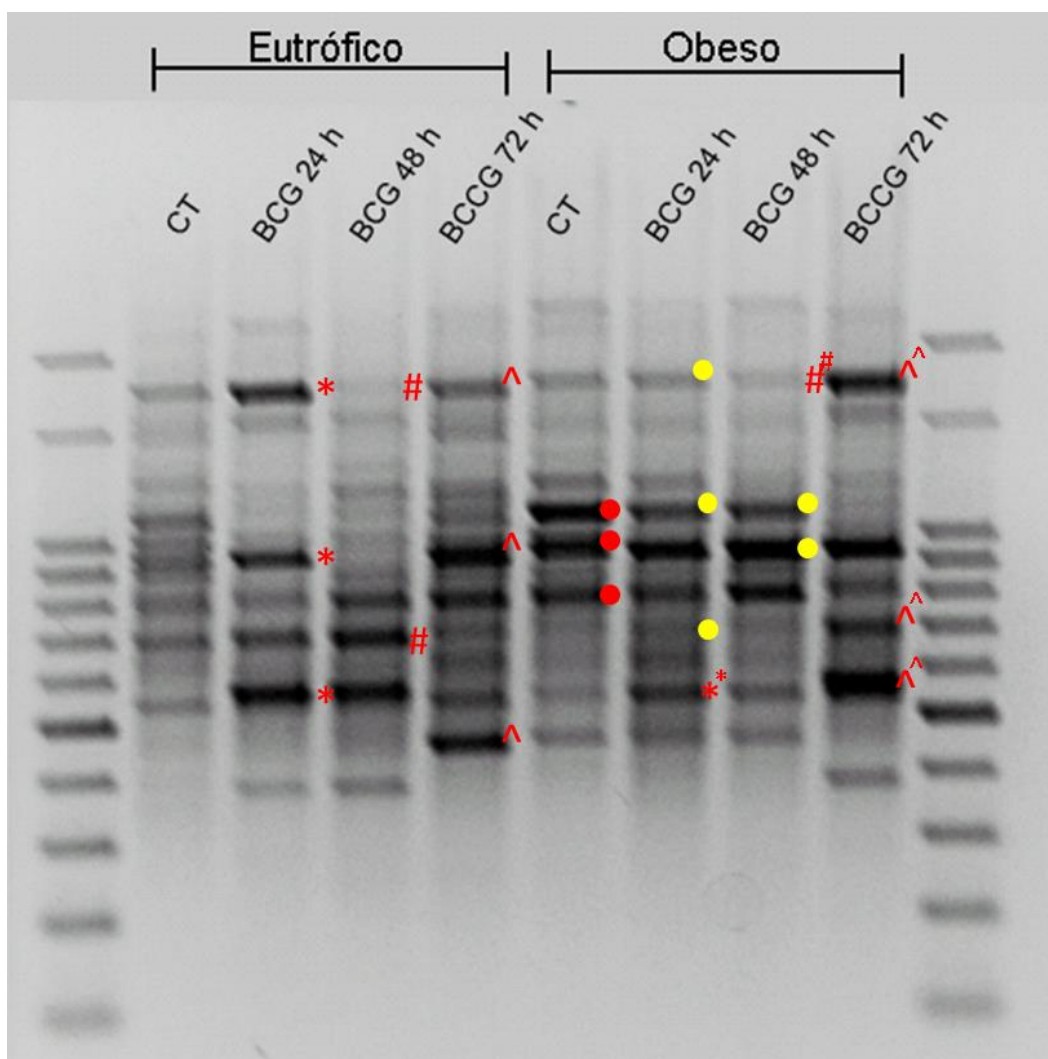


**Figura 17. Infiltrado inflamatório intestinal de camundongos eutróficos e obesos infectados ou não por *M. bovis* BCG.** (A) Histologia da última porção do intestino de camundongos eutróficos (EU) ou obesos (OB) infectados ou não por *M. bovis* BCG corada com hematoxilina-eosina. Imagens obtidas através do Panoramic Scan 150 BF. (B) Área relativa ao tamanho do infiltrado inflamatório. Gráfico obtido através do programa GraphPad Prism 5.

#### **4.8 A obesidade retardou a mudança da estrutura da microbiota intestinal frente a infecção por *M. bovis* BCG**

Por fim, para analisarmos a estrutura da microbiota intestinal, amostras fecais foram coletadas de camundongos não infectados ou 24, 48 e 72 horas após a infecção. Assim, foi possível observar que os camundongos obesos apresentaram uma composição microbiana diferente quando comparados aos eutróficos (Figura 18, ●). Nos camundongos eutróficos foi possível observar que infecção por *M. bovis* BCG rapidamente modificou a estrutura da comunidade microbiana, apresentando variações tanto em relação ao controle, como em relação ao tempo de infecção em 24, 48 e 72 horas (Figura 18, \*, # e ^). Em relação a obesidade e infecção

micobacteriana, foi possível observar que a obesidade retardou a mudança da estrutura da microbiota intestinal. Além disso, sutis mudanças são observadas com 24 e 48 horas pós infecção (Figura 18, \* e ##) e mudanças mais claras são observadas com 72 horas pós infecção (Figura 18, ^). Ainda, em comparação entre os obesos e eutróficos nos tempos de infecção, foi possível observar que os animais infectados e analisados no tempo de 24 horas e de 48 horas, apresentam uma composição microbiana diferente (Figura 18, ●)



**Figura 18. Análise da composição estrutural da microbiota de camundongos eutróficos ou obesos, infectados ou não por *M bovis* BCG.** Amostras fecais foram coletadas diariamente para identificar a composição da estrutura microbiana intestinal. O DNA foi extraído usando o kit QIAamp™ DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), com o auxílio da plataforma automatizada QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemanha).

## 5 DISCUSSÃO

Os efeitos da obesidade no sistema imune continuam como um assunto bem complexo. Trabalhos recentes estão estudando a associação entre TB e obesidade, e mostram que pessoas com baixos índice de massa corporal (IMC) se mostraram mais suscetíveis ao desenvolvimento da TB ativa (Falagas and Kompoti, 2006; Semunigus et al. 2016). Além disso, outros estudos mostraram que a obesidade ou o sobrepeso estão relacionados à diminuição do risco de desenvolverem TB ativa (Cegielski et al. 2012; Leung et al. 2007). Yen et al. (2017) observou uma relação linear entre IMC e TB, na qual para cada aumento de unidade do IMC, havia uma redução de 8% no risco de desenvolvimento da TB ativa.

Estudos anteriores mostram que este possível efeito protetor do alto IMC, que caracteriza a obesidade, pode se dar pela regulação dos níveis de citocinas ou pela atividade de linfócitos T, influenciados também pela ação da leptina. Além disso, também demonstraram que a leptina foi associada ao aumento da imunidade de linfócitos T, com aumento do número de linfócitos T CD4+ tipo-1 (La Cava and Matarese, 2004), o que pode reduzir o risco da infecção por TB ativa. Uma menor virulência de micobactérias em ambientes enriquecidos com lipídios e os efeitos imunomoduladores da leptina são alguns dos argumentos que podem explicar o menor risco de desenvolvimento de TB ativa em pessoas obesas ou com sobrepeso.

Já é bem estabelecido que as citocinas do sistema imune inato e adaptativo orquestram a imunidade a TB, com citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , por exemplo, ambas envolvidas na proteção ao desenvolvimento doença (Cooper and Khader, 2008; Mayer-Barber and Sher, 2015). A partir disso, foi demonstrado que pessoas com altos IMC apresentaram níveis sistêmicos elevados da maioria das citocinas pró-inflamatórias e níveis diminuídos de citocinas anti-inflamatórias (Anuradha et al. 2016). Assim, é possível sugerir que o IMC elevado está relacionado a níveis elevados de citocinas protetoras contra a TB e níveis baixos de citocinas regulatórias, possivelmente contribuem para um mecanismo de maior proteção contra a TB ativa.

Com isso, conseguimos identificar que os níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (KC e TNF- $\alpha$ ) se encontram elevados durante a



infecção micobacteriana. Indicando a modulação do estado inflamatório do hospedeiro pela micobactéria, promovendo um estado inflamatório que possa vir a favorecer o patógeno.

Além disso, nossos dados demonstram que os camundongos obesos infectados, apresentaram uma diminuição significativa da síntese de IL-10, uma citocina de perfil anti-inflamatório, no tempo de 48 horas quando comparados aos eutróficos também infectados. Já foi demonstrado que a infecção por *M. tuberculosis* é capaz de modular os níveis de IL-10, inibindo a resposta imune contra a TB (McNab et al, 2014). Isso sugere que a interação entre a micobactéria e o hospedeiro, está regulando positivamente os níveis de IL-10, muito provavelmente para favorecer a sobrevivência do patógeno. Porém a obesidade parece suprimir os níveis de IL-10, sugerindo um possível mecanismos do efeito protetor da obesidade frente a Tuberculose.

Na literatura, encontramos dados que mostram que os fagossomas contendo micobactérias envolvem os corpúsculos lipídicos (Peyron et al. 2008). Este processo favorece a micobactéria, onde algumas se transferem para o interior dos corpúsculos lipídicos e conseguem acumular para si, lipídios provenientes das células hospedeiras (Peyron et al. 2008). A presença desses lipídeos no interior das micobactérias é um indicador de micobactérias não replicantes, que se encontram em estado de dormência (Garton et al. 2002).

Dados do nosso grupo já demonstraram que a infecção por *M. bovis* leva ao aumento do acúmulo de lipídios em macrófagos e a modulação da resposta imune (Almeida et al. 2014). Além de também já demonstrarmos que corpúsculos lipídicos também são desencadeados por *M. leprae*, como uma estratégia eficaz para adquirir lipídios para si e modular a resposta imune a fim de favorecer a sua sobrevivência (Mattos et al., 2011).

Assim, podemos sugerir que esta modulação da imunidade do hospedeiro com 48 horas pós-infecção, acaba por promover um aumento no número de corpúsculos lipídicos. Entre os animais obesos infectados, um aumento significativo do número de corpúsculos lipídicos foi encontrado no tempo de 48 horas em comparação ao tempo de 24 horas pós-infecção. Bem como, 72 horas pós-infecção, entre os camundongos obesos e eutróficos, foi observado um aumento significativo do número de corpúsculos lipídicos.

A identificação de grandes áreas de infiltrado inflamatório no intestino dos animais infectados nos permite sugerir que a infecção induz o aparecimento e aumento desse infiltrados. E de forma mais homogênea e rápida, a obesidade pareceu contribuir para o surgimento dessas áreas infiltradas. Estes infiltrados inflamatórios podem ser uma porta de comunicação e sinalização entre as células do sistema imune e os componentes da microbiota intestinal desses camundongos. Portanto, um aumento desses infiltrados pode significar uma maior interação entre sistema imunológico e microbiota intestinal, além de poder induzir maiores mudanças na estrutura da comunidade microbiana e no perfil das células imunes.

Cada vez mais, novos estudos confirmam a interação entre microbiota e obesidade. Essa influência da microbiota sobre o desenvolver da obesidade está associada ao aumento da extração de energia dos alimentos, a falta da regulação sobre a saciedade e criando uma resposta inflamatória latente. O favorecimento na captação de energia se dá através da fragmentação de macromoléculas dietéticas complexas, síntese de micronutrientes, fermentação de substâncias alimentares indigestíveis, assistência na absorção de eletrólitos e crescimento e diferenciação do epitélio intestinal, através da regulação dos diversos aspectos da diferenciação celular e expressão gênica (Gill et al. 2006; Hooper et al. 2012). Quanto maior a eficiência de extração de energia da microbiota, mais predisposição de um indivíduo pode ter para o desenvolvimento da obesidade. (Backhed et al. 2004). Além disso, a microbiota residente e seus metabólitos regulam a expressão de genes envolvidos no processamento e absorção de carboidratos e lipídios complexos no tecido adiposo do hospedeiro, favorecendo o armazenamento de gordura.

Com o avanço nas pesquisas relacionadas à microbiota e obesidade, já foi observado que o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), um componente estrutural importante das paredes celulares das bactérias gram negativas, pode atuar como um fator desencadeante que liga a inflamação sistêmica à síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura. (Cani et al. 2007). Foi observado que animais injetados com LPS apresentaram aumento de peso e resistência a insulina, sem afetar a ingestão de energia (Cani et al. 2007). Em um diferente estudo, observou-se que o aumento na captação de energia estava relacionado com a predominância do grupo Firmicutes e a redução nos Bacteroidetes (Jumpertz et al. 2011). Além disso, já foi demonstrado que pessoas obesas e eutróficas apresentam diferenças no balanceamento entre os grupos Bacteroidetes e Firmicutes em sua composição da

microbiota intestinal. Pessoas obesas apresentam dominância de Firmicutes, enquanto nos eutróficos ocorre uma dominância por parte dos Bacteroidetes (Ley et al. 2006).

Assim, nossos dados corroboram os estudos anteriores, onde observamos que a dieta hiperlipídica promove o desenvolvimento de sobrepeso e obesidade e que o quadro de obesidade é acompanhado por uma mudança no perfil estrutural da microbiota intestinal entre os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta convencional. Além disso, a obesidade parece fornecer um quadro de resistência a mudanças de estrutura por parte da microbiota intestinal.

Com isso, podemos sugerir que o possível efeito protetor da obesidade ao desenvolvimento da TB pode se dar, além de outras formas, pela resistência a mudança de perfil estrutural da microbiota intestinal e consequente estimulação do sistema imune. Assim, ainda podemos sugerir que a mudança do estado de TB latente para o estado de TB ativa possa se dar pela ação da microbiota em conjunto com o sistema imune.

## 6 CONCLUSÕES

- Os impactos da dieta na aquisição ou perda de peso nos levam a considerar cada vez com mais atenção o papel modulador da microbiota intestinal;
- Demostramos que a comorbidade entre obesidade e tuberculose modula os níveis de citocinas do hospedeiro;
- A modulação da formação de corpúsculos lipídicos pode ser influenciada pela obesidade durante a infecção micobacteriana;
- Um maior número e um aumento rápido na área de infiltrados inflamatórios intestinal foram observados durante a infecção micobacteriana na obesidade;
- A necessidade de mais estudos sobre a obesidade e os componentes da microbiota intestinal se mostra cada vez mais importante na interação com o sistema imune.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly, M. T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C. M., Carrossini, N., Robbs, B. K., Oliveira, S. S., & Viola, J. P. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer research*, 68(6), 1732-1740.
- Algood, H. M. S., Lin, P. L., Yankura, D., Jones, A., Chan, J., & Flynn, J. L. (2004). TNF influences chemokine expression of macrophages *in vitro* and that of CD11b+ cells *in vivo* during Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of Immunology*, 172(11), 6846-6857..
- Almeida, L.B., Marinho, C.B., Souza, C.S. & Cheib, V.B.P. (2009) Disbiose intestinal. *Rev Bras Nutr Clin.*, 24(1):58-65.
- Almeida, P. E., Roque, N. R., Magalhães, K. G., Mattos, K. A., Teixeira, L., Maya-Monteiro, C., Almeida, C.J., Castro-Faria-Neto, H.C., Ryffel, B., Quesniaux, V.F. & Bozza, P. T. (2014). Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(1), 97-107.
- Almeida, P. E., Silva, A. R., Maya-Monteiro, C. M., Töröcsik, D., Heloisa, D., Dezsö, B., Magalhães K. G., Castro-Faria-Neto, H.C., Nagy, L. & Bozza, P. T. (2009). Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *The Journal of immunology*, 183(2), 1337-1345.
- Andreazzi, A. E., Scomparin, D. X., Mesquita, F. P., Balbo, S. L., Gravena, C., De Oliveira, J. C. & Mathias, P. C. F. (2009). Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. *Journal of Endocrinology*, 201(3), 351-359.
- Anuradha, R., Munisankar, S., Bhootra, Y., Dolla, C., Kumaran, P., & Babu, S. (2016). High body mass index is associated with heightened systemic and mycobacterial antigen-Specific pro-inflammatory cytokines in latent tuberculosis. *Tuberculosis*, 101, 56-61.
- Armstrong, J. A., & Hart, P. A. (1975). 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*, 142(1), 1-16.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A. & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718-15723.

- Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 979-984.
- Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A., & Sher, A. (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Experimental Medicine*, 202(12), 1715-1724.
- Bertagnolli, M. M., Lin, B. Y., Young, D., & Herrmann, S. H. (1992). IL-12 augments antigen-dependent proliferation of activated T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 149(12), 3778-3783.
- Bervoets, L., Van Hoorenbeeck, K., Kortleven, I., Van Noten, C., Hens, N., Vael, C., & Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut pathogens*, 5(1), 10.
- Bowdish, D. M., Sakamoto, K., Kim, M. J., Kroos, M., Mukhopadhyay, S., Leifer, C. A., ... & Russell, D. G. (2009). MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 5(6), e1000474.
- Bozza, P. T., & Bandeira-Melo, C. (2005). Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 113-120.
- Bozza, P. T., Melo, R. C., & Bandeira-Melo, C. (2007). Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacology & therapeutics*, 113(1), 30-49.
- Brasaemle, D. L., Dolios, G., Shapiro, L., & Wang, R. (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 46835-46842.
- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., ... & Brennan, P. J. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285(5428), 732-736.
- Calder, P. C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K., ... & Marcos, A. (2011). Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*, 106(S3), S1-S78.
- Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2011). The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology & therapeutics*, 130(2), 202-212.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., & Waget, A. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772.

- Cegielski, J. P., Arab, L., & Cornoni-Huntley, J. (2012). Nutritional risk factors for tuberculosis among adults in the United States, 1971–1992. *American journal of epidemiology*, kws007.
- Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S., & Bloom, B. R. (1992). Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 175(4), 1111-1122.
- Cooper, A. M., & Khader, S. A. (2008). The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunological reviews*, 226(1), 191-204.
- Cooper, A. M., Roberts, A. D., Rhoades, E. R., Callahan, J. E., Getzy, D. M., & Orme, I. M. (1995). The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*, 84(3), 423.
- Crowe, C. C., Sanders, W. E., & Longley, S. (1973). Bacterial interference. II. Role of the normal throat flora in prevention of colonization by group A *Streptococcus*. *Journal of Infectious Diseases*, 128(4), 527-532.
- D'Avila, H., Melo, R. C., Parreira, G. G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. (2006). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. *The Journal of Immunology*, 176(5), 3087-3097.
- da Silva, S. T., dos Santos, C. A., & Bressan, J. (2013). Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics. *Nutr Hosp*, 28(4), 1039-48.
- Dai, G., & McMurray, D. N. (1998). Altered cytokine production and impaired antimycobacterial immunity in protein-malnourished guinea pigs. *Infection and immunity*, 66(8), 3562-3568.
- de Heredia, F. P., Gómez-Martínez, S., & Marcos, A. (2012). Obesity, inflammation and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(02), 332-338.
- Denis, M. (1991). Human neutrophils, activated with cytokines or not, do not kill virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases*, 163(4), 919-920.
- Denis, M., & Gregg, E. O. (1991). Recombinant interleukin-6 increases the intracellular and extracellular growth of *Mycobacterium avium*. *Canadian journal of microbiology*, 37(6), 479-483.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., & Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biol*, 6(11), e280.
- DiBaise, J. K., Zhang, H., Crowell, M. D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G. A., & Rittmann, B. E. (2008). Gut microbiota and its possible relationship with obesity. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 83, No. 4, pp. 460-469). Elsevier.

- Dorhoi, A., & Kaufmann, S. H. (2014). Perspectives on host adaptation in response to *Mycobacterium tuberculosis*: modulation of inflammation. In *Seminars in immunology* (Vol. 26, No. 6, pp. 533-542). Academic Press.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.
- Etna, M. P., Giacomini, E., Severa, M., & Coccia, E. M. (2014). Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis. In *Seminars in immunology* (Vol. 26, No. 6, pp. 543-551). Academic Press.
- Eum, S. Y., Kong, J. H., Hong, M. S., Lee, Y. J., Kim, J. H., Hwang, S. H., ... & Barry, C. E. (2010). Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*, 137(1), 122-128.
- Falagas, M. E., & Kompoti, M. (2006). Obesity and infection. *The Lancet infectious diseases*, 6(7), 438-446.
- Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., & Bloom, B. R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 178(6), 2249-2254.
- Fremond, C. M., Yeremeev, V., Nicolle, D. M., Jacobs, M., Quesniaux, V. F., & Ryffel, B. (2004). Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *The Journal of clinical investigation*, 114(12), 1790-1799.
- Gan, H., He, X., Duan, L., Mirabile-Levens, E., Kornfeld, H., & Remold, H. G. (2005). Enhancement of antimycobacterial activity of macrophages by stabilization of inner mitochondrial membrane potential. *The Journal of infectious diseases*, 191(8), 1292-1300.
- Gao, L. Y., & Kwai, Y. A. (2000). The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends in microbiology*, 8(7), 306-313.
- Garton, N. J., Christensen, H., Minnikin, D. E., Adegbola, R. A., & Barer, M. R. (2002). Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria *in vitro* and in sputum. *Microbiology*, 148(10), 2951-2958.
- Genoni, G., Prodam, F., Marolda, A., Giglione, E., Demarchi, I., Bellone, S., & Bona, G. (2014). Obesity and infection: two sides of one coin. *European journal of pediatrics*, 173(1), 25-32.
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S. & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*, 312(5778), 1355-1359.
- Glass, C. K., & Olefsky, J. M. (2012). Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell metabolism*, 15(5), 635-645.



- Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C. L., & Anis, A. H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*, 9(1), 88.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(5), 367-377.
- Guyot-Revol, V., Innes, J. A., Hackforth, S., Hinks, T., & Lalvani, A. (2006). Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173(7), 803-810.
- Hellmann, J., Zhang, M. J., Tang, Y., Rane, M., Bhatnagar, A., & Spite, M. (2013). Increased saturated fatty acids in obesity alter resolution of inflammation in part by stimulating prostaglandin production. *The Journal of Immunology*, 191(3), 1383-1392.
- Herbert, S. P., Huisken, J., Kim, T. N., Feldman, M. E., Houseman, B. T., Wang, R. A., & Stainier, D. Y. (2009). Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science*, 326(5950), 294-298.
- Hirsch, C. S., Hussain, R., Toossi, Z., Dawood, G., Shahid, F., & Ellner, J. J. (1996). Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3193-3198.
- Hooper, D. U., Adair, E. C., Cardinale, B. J., Byrnes, J. E., Hungate, B. A., Matulich, K. L., & O'Connor, M. I. (2012). A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature*, 486(7401), 105-108.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition*, 22(1), 283-307.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860-867.
- Hsu, Y. M. S., Zhang, Y., You, Y., Wang, D., Li, H., Duramad, O., & Lin, X. (2007). The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nature immunology*, 8(2), 198-205.
- Jarchum, I., Liu, M., Lipuma, L., & Pamer, E. G. (2011). Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infection and immunity*, 79(4), 1498-1503.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., & Jansson, J. K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal*, 1(1), 56-66.
- Jones, B. W., Means, T. K., Heldwein, K. A., Keen, M. A., Hill, P. J., Belisle, J. T., & Fenton, M. J. (2001). Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *Journal of leukocyte biology*, 69(6), 1036-1044.

- Jones, G. S., Amirault, H. J., & Andersen, B. R. (1990). Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. *Journal of Infectious Diseases*, 162(3), 700-704.
- Jumpertz, R., Le, D. S., Turnbaugh, P. J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J. I., & Krakoff, J. (2011). Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 94(1), 58-65.
- Kalupahana, N. S., Moustaid-Moussa, N., & Claycombe, K. J. (2012). Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Molecular aspects of medicine*, 33(1), 26-34.
- Kamijo, R., Le, J., Shapiro, D., Havell, E. A., Huang, S., Aguet, M., ... & Vilcek, J. (1993). Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guérin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, 178(4), 1435-1440.
- Kaminski, D. A., & Randall, T. D. (2010). Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Trends in immunology*, 31(10), 384-390.
- Keane, J., Balcewicz-Sablinska, M. K., Remold, H. G., Chupp, G. L., Meek, B. B., Fenton, M. J., & Kornfeld, H. (1997). Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infection and immunity*, 65(1), 298-304.
- Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C. C., LaPoint, K., & McIntosh, M. (2008). Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *The Journal of nutrition*, 139(1), 1-4.
- Khan, N., Aurobind Vidyarthi, S. N., Negi, S., Nair, G., & Agrewala, J. N. (2016). Alteration in the gut microbiota provokes susceptibility to tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 7.
- Kuerschner, L., Moessinger, C., & Thiele, C. (2008). Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, 9(3), 338-352.
- Kwon, O., Kim, K. W., & Kim, M. S. (2016). Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(7), 1457-1477.
- La Cava, A., & Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4(5), 371-379.
- Lam, Q. L., & Lu, L. (2007). Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol*, 4(1), 1-13.
- Law, K. F., Jagirdar, J., Weiden, M. D., Bodkin, M., & Rom, W. N. (1996). Tuberculosis in HIV-positive patients: cellular response and immune activation in the lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 153(4), 1377-1384.
- Lee, Y. A., Choi, H. M., Lee, S. H., Yang, H. I., Yoo, M. C., Hong, S. J., & Kim, K. S. (2012). Synergy between adiponectin and interleukin-1 $\beta$  on the expression of

interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in fibroblast-like synoviocytes. *Experimental & molecular medicine*, 44(7), 440-447.

Leung, C. C., Lam, T. H., Chan, W. M., Yew, W. W., Ho, K. S., Leung, G., & Chang, K. C. (2007). Lower risk of tuberculosis in obesity. *Archives of internal medicine*, 167(12), 1297-1304.

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070-11075.

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022.

Mackowiak, P. A. (1982). The normal microbial flora. *New England Journal of Medicine*, 307(2), 83-93.

Majlessi, L., Sayes, F., Bureau, J. F., Pawlik, A., Michel, V., Jouvion, G., & Brosch, R. (2017). Colonization with *Helicobacter* is concomitant with modified gut microbiota and drastic failure of the immune control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunology*.

Mancuso, P., Gottschalk, A., Phare, S. M., Peters-Golden, M., Lukacs, N. W., & Huffnagle, G. B. (2002). Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *The Journal of Immunology*, 168(8), 4018-4024.

Manukyan, M., Triantafilou, K., Triantafilou, M., Mackie, A., Nilsen, N., Espevik, T., ... & Heine, H. (2005). Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. *European journal of immunology*, 35(3), 911-921.

Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*, 27, 451-483.

Mattos, K. A., D'Avila, H., Rodrigues, L. S., Oliveira, V. G., Sarno, E. N., Atella, G. C., & Pessolani, M. C. V. (2010). Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Journal of leukocyte biology*, 87(3), 371-384.

Mattos, K. A., Lara, F. A., Oliveira, V. G., Rodrigues, L. S., D'Avila, H., Melo, R. C., ... & Pessolani, M. C. V. (2011). Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cellular microbiology*, 13(2), 259-273.

Mattos, K. A., Oliveira, V. C., Berrêdo-Pinho, M., Amaral, J. J., Antunes, L. C. M., Melo, R. C., & Rosa, P. S. (2014). *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cellular microbiology*, 16(6), 797-815.

Mattos, K. A., Oliveira, V. G., D'Avila, H., Rodrigues, L. S., Pinheiro, R. O., Sarno, E. N., ... & Bozza, P. T. (2011). TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*.

infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *The Journal of Immunology*, 187(5), 2548-2558

Maury, E., & Brichard, S. M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*, 314(1), 1-16.

Mayer-Barber, K. D., & Sher, A. (2015). Cytokine and lipid mediator networks in tuberculosis. *Immunological reviews*, 264(1), 264-275.

Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231-241.

McNab, F. W., Ewbank, J., Howes, A., Moreira-Teixeira, L., Martirosyan, A., Ghilardi, N., ... & O'Garra, A. (2014). Type I IFN Induces IL-10 Production in an IL-27–Independent Manner and Blocks Responsiveness to IFN- $\gamma$  for Production of IL-12 and Bacterial Killing in Mycobacterium tuberculosis–Infected Macrophages. *The Journal of Immunology*, 193(7), 3600-3612.

Means, T. K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D. T., & Fenton, M. J. (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 163(7), 3920-3927.

Melo, R. C. N., D'Ávila, H., Fabrino, D. L., Almeida, P. E., & Bozza, P. T. (2003). Macrophage lipid body induction by Chagas disease *in vivo*: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue and cell*, 35(1), 59-67.

Miller, B. H., Fratti, R. A., Poschet, J. F., Timmins, G. S., Master, S. S., Burgos, M., ... & Deretic, V. (2004). Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infection and immunity*, 72(5), 2872-2878.

Milner, J. J., & Beck, M. A. (2012). The impact of obesity on the immune response to infection. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(02), 298-306.

Ministério da Saúde. 2015. "Vigilância de Fatores de Risco E Proteção Para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico (VIGITEL) Brasil 2014." <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/15/PPT-Vigitel-2014-.pdf>.

Murphy, E. F., Cotter, P. D., Healy, S., Marques, T. M., O'sullivan, O., Fouhy, F., & Ross, P. R. (2010). Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*, 59(12), 1635-1642.

Nguyen, L., & Pieters, J. (2005). The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends in cell biology*, 15(5), 269-276.

Olofsson, S. O., Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., & Borén, J. (2009). Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 448-458.

Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Smith, E., Shanley, C., Harton, M., Troudt, J., & Chan, E. D. (2008). Animal model of Mycobacterium abscessus lung infection. *Journal of leukocyte biology*, 83(6), 1502-1511.

Organização Mundial da Saúde. 2016. "Obesity and Overweight." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

Paniagua, J. A. (2016). Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World Journal of Diabetes*, 7(19), 483.

Parfrey, L. W., Walters, W. A., & Knight, R. (2011). Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions. *Human health and disease in a microbial world*, 68.

Patterson, E., Ryan, P. M., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate medical journal*, postgradmedj-2015.

Paul, A., Chang, B. H. J., Li, L., Yechoor, V. K., & Chan, L. (2008). Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Circulation research*, 102(12), 1492-1501.

Penders, J., Thijs, C., van den Brandt, P. A., Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F., & Stobberingh, E. E. (2007). Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*, 56(5), 661-667.

Perry, S., De Jong, B. C., Solnick, J. V., De La Luz Sanchez, M., Yang, S., Lin, P. L., & Adegbola, R. A. (2010). Infection with *Helicobacter pylori* is associated with protection against tuberculosis. *PloS one*, 5(1), e8804.

Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., & de Chastellier, C. (2008). Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog*, 4(11), e1000204.

Quesniaux, V. J., Nicolle, D. M., Torres, D., Kremer, L., Guérardel, Y., Nigou, J., ... & Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *The Journal of Immunology*, 172(7), 4425-4434.

Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gérard, P., Harach, T., Moser, M., ... & Chou, C. J. (2010). Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *The FASEB Journal*, 24(12), 4948-4959.

Rajaram, M. V., Brooks, M. N., Morris, J. D., Torrelles, J. B., Azad, A. K., & Schlesinger, L. S. (2010). Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *The Journal of Immunology*, 185(2), 929-942.

- Rakatzi, I., Mueller, H., Ritzeler, O., Tennagels, N., & Eckel, J. (2004). Adiponectin counteracts cytokine-and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetologia*, 47(2), 249-258.
- Rangel Moreno, J., Estrada García, I., De La Luz García Hernández, M., Aguilar Leon, D., Marquez, R., & Hernández Pando, R. (2002). The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 106(2), 257-266.
- Ray, I., Mahata, S. K., & De, R. K. (2016). Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Frontiers in Endocrinology*, 7.
- Riedel, D. D., & Kaufmann, S. H. (1997). Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with Mycobacterium tuberculosis and lipoarabinomannan. *Infection and immunity*, 65(11), 4620-4623.
- Ryffel, B., Fremont, C., Jacobs, M., Parida, S., Botha, T., Schnyder, B., & Quesniaux, V. (2005). Innate immunity to mycobacterial infection in mice: critical role for toll-like receptors. *Tuberculosis*, 85(5), 395-405.
- Schäffler, A., & Schölmerich, J. (2010). Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends in immunology*, 31(6), 228-235.
- Seiler, P., Aichele, P., Bandermann, S., Hauser, A. E., Lu, B., Gerard, N. P., ... & Kaufmann, S. H. (2003). Early granuloma formation after aerosol Mycobacterium tuberculosis infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *European journal of immunology*, 33(10), 2676-2686.
- Sell, H., & Eckel, J. (2010). Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(4), 366-370.
- Semunigus, T., Tessema, B., Eshetie, S., & Moges, F. (2016). Smear positive pulmonary tuberculosis and associated factors among homeless individuals in Dessie and Debre Birhan towns, Northeast Ethiopia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 50.
- Smith, K., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. In *Seminars in immunology* (Vol. 19, No. 2, pp. 59-69). Academic Press.
- Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J., ... & Gordon, J. I. (2005). Glycan foraging *in vivo* by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, 307(5717), 1955-1959.
- Spezia, G., da Silva, L. T., dos Santos, S. P., Liberali, R., & Navarro, F. (2012). Microbiota intestinal e sua relação com a obesidade. *RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, 3(15).
- Tan, B. H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M. T., ... & Stenger, S. (2006). Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial

activity against intracellular pathogens. *The Journal of Immunology*, 177(3), 1864-1871.

Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., & Dore, J. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental microbiology*, 11(10), 2574-2584.

Toossi, Z., Sedor, J. R., Lapurga, J. P., Ondash, R. J., & Ellner, J. J. (1990). Expression of functional interleukin 2 receptors by peripheral blood monocytes from patients with active pulmonary tuberculosis. *The Journal of clinical investigation*, 85(6), 1777-1784.

Triantafilou, M., Sawyer, D., Nor, A., Vakakis, E., & Triantafilou, K. (2008). Cell surface molecular chaperones as endogenous modulators of the innate immune response. In *Novartis Foundation symposium* (Vol. 291, p. 74). Chichester; New York; John Wiley.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 444(7122), 1027.

Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H., & van der Meer, J. W. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 294-309.

VanHeyningen, T. K., Collins, H. L., & Russell, D. G. (1997). IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *The Journal of Immunology*, 158(1), 330-337.

Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO reports*, 13(12), 1079-1086.

Vieira-de-abreu, A., Calheiros, A. S., Mesquita-Santos, F. P., Magalhães, E. S., Mourao-Sa, D., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, M.T., Bandeira-Melo, C., & Bozza, P. T. (2011). Crosstalk between MIF and eotaxin in allergic eosinophil activation forms LTC<sub>4</sub>-synthesizing lipid bodies. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 44:4.

Wellen, K. E., & Hotamisligil, G. S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1785-1788.

Wieland, C. W., Florquin, S., Chan, E. D., Leemans, J. C., Weijer, S., Verbon, A., & Van Der Poll, T. (2005). Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in leptin-deficient ob/ob mice. *International immunology*, 17(11), 1399-1408.

Wolins, N. E., Rubin, B., & Brasaemle, D. L. (2001). TIP47 associates with lipid droplets. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 5101-5108.

Wulster-Radcliffe, M. C., Ajuwon, K. M., Wang, J., Christian, J. A., & Spurlock, M. E. (2004). Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 316(3), 924-929.

Xu, J., Bjursell, M. K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L. K., Chiang, H. C., ... & Gordon, J. I. (2003). A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science*, 299(5615), 2074-2076.

Yen, Y. F., Hu, H. Y., Lee, Y. L., Ku, P. W., Lin, I. F., Chu, D., & Lai, Y. J. (2017). Obesity/overweight reduces the risk of active tuberculosis: a nationwide population-based cohort study in Taiwan. *International Journal of Obesity*, 41(6), 971-975.

Zaffran, Y., Zhang, L., & Ellner, J. J. (1998). Role of CR4 in Mycobacterium tuberculosis-human macrophages binding and signal transduction in the absence of serum. *Infection and immunity*, 66(9), 4541-4544.