

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

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.

Orientador: Prof. Dr. Patrícia E de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Claudio CG Diniz

Juiz de Fora - Minas Gerais
Março de 2018

RESUMO

A microbiota residente, área anteriormente negligenciada pelas ciências microbianas, surgiu recentemente com um importante fator da fisiologia humana, apresentando uma complexa e recíproca interação com o sistema imunológico, principalmente na capacidade de estimular e direcionar a imunidade inata e adquirida. Entretanto, o papel da microbiota residente em favorecer ou não o desenvolvimento de processos infecciosos permanece pouco explorado. Estudos recentes demonstraram que a microbiota residente pode interferir no curso de doenças como obesidade, asma e diferentes doenças inflamatórias, onde mudanças em sua composição afetam a homeostase. O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento da microbiota residente na fisiopatologia da doença e sua interação com o sistema imune em camundongos obesos no modelo de tuberculose experimental. Para isso, nós utilizamos camundongos C57BL6, alimentados com dieta hiperlipídica e infectados ou não por *M. bovis* BCG. Assim, conseguimos observar que a indução de obesidade por dieta hiperlipídica altera a estrutura da microbiota intestinal e que a comorbidade obesidade-tuberculose altera a síntese de citocinas e a formação de corpúsculos lipídicos. Além disso, observamos que os camundongos obesos infectados por *M. bovis* BCG apresentaram uma resistência à mudança de estrutura da microbiota intestinal quando comparados aos eutróficos. 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 colonização da microbiota intestinal e consequente estimulação do sistema imune.

Palavras-chave: Obesidade. Microbiota. Tuberculose.

ABSTRACT

The resident microbiota, an area previously neglected by microbial sciences, has recently emerged as an important factor in human physiology due to its complex and reciprocal interaction with the immune system mainly in the ability to stimulate and direct innate and acquired immunity. However, the resident microbiota role in favor or not the infectious processes development remains poorly explored. Recent studies have shown that resident microbiota may interfere with diseases courses such as obesity, asthma, and different inflammatory diseases when changes in its composition affect homeostasis. The goal of this work evaluated the resident microbiota involvement in the pathophysiology of diseases and its interaction with the immune system in obese mice in the experimental tuberculosis model. For this, we used C57BL6 mice, fed a hyperlipidic diet and infected or not by *M. bovis* BCG. Thus, we observed an obesity induction by hyperlipid diet altering the structure of intestinal microbiota and obesity-tuberculosis comorbidity alters the synthesis of cytokines and a formation of lipid bodies. In addition, we observed that obese mice infected with *M. bovis* BCG presented a resistance to the change of structure of the intestinal microbiota when compared to the eutrophic. With this, we can suggest that the possible protective effect of obesity on the development of TB can occur, in other forms, by resistance to colonization of the intestinal microbiota and consequent stimulation of the immune system.

Keywords: Obesity. Microbiota. Tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da obesidade pelo mundo.....	9
Figura 2. Composição da microbiota intestinal humana.....	12
Figura 3. Estimativa de novos casos de Tuberculose ao redor do mundo.....	14
Figura 4. Formação do corpúsculo lipídico. Adaptado de Thiam et al. 2013.	
Figura 5. Diferentes marcações em corpúsculo lipídicos. Adaptado de Bozza et al. 2009.	
Figura 6. Peso médio dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.....	21
Figura 7. Índice de Lee dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica.....	22
Figura 8. Comparação entre as gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos eutróficos ou obesos.....	23
Figura 9. Formação de Corpúsculos Lipídicos nas células do lavado pleural após 24, 48 ou 72 h de infecção por <i>M. bovis</i> BCG.....	24
Figura 10: Estudo da síntese de citocinas produzidos por leucócitos pleurais infectados ou não por BCG.....	25

Figura 11. Análise da composição estrutural da microbiota de camundongos eutróficos ou obesos, infectados ou não por *M bovis* BCG.....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de preparo da ração hiperlipídica....19

LISTA DE ABREVIATURAS

ADRP	Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência Adquirida
BCG	Bacilo Calmett-Guérin
BSA	Albumina soro bovina
CD	Grupo de diferenciação
CEUA	Comitê de ética de experimentação animal
CL	Corpúsculo Lipídico
COX	Ciclooxigenase
DAPI	4'6'-diamidino-2- fenilindol
DC	Célula dendrítica
DMSO	Dimetil Sulfoxida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EPM	Erro padrão médio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
I.T.	Intratorácico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRF	Fatores reguladores de interferon
KC	Keratinocyte chemoattractant
KO	Knockout
LAM	Lipoarabinomanana
LO	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MR	Receptores de manose

mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
PAT	Família composta por perilipina, ADRP e TIP47
PBS	Tampão fosfatado
PG	Prostaglandina
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos
RE	Retículo Endoplasmático
TB	Tuberculose
TGF	Fator de transformação do crescimento
TLR	Receptores semelhantes à Toll
TNF	Fator de Necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	
1.1	OBESIDADE.....	
1.2	INFLAMAÇÃO E OBESIDADE.....	
1.3	MICROBIOTA.....	
1.3.1	MICROBIOTA E INFECÇÃO MICOBACTERIANA.....	
1.4	TUBERCULOSE.....	
1.5	METABOLISMO LIPÍDICO.....	
1.5.1	CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	
2	OBJETIVOS.....	
2.1	OBJETIVO GERAL.....	
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	
2.3	OBJETIVOS FUTUROS.....	
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	
3.1	ANIMAIS.....	
3.2	INDUÇÃO DA OBESIDADE.....	
3.3	<i>MYCOBACTERIUM BOVIS, BCG</i>	
3.4	ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	
3.5	PLEURISIA INDUZIDA POR BCG.....	
3.6	AQUISIÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	
3.7	CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS.....	
3.8	CONTAGEM DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	
3.9	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	
4	RESULTADOS.....	
5	DISCUSSÃO.....	
6	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

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. Portanto, indivíduos obesos apresentam uma fisiologia interna diferente dos indivíduos eutróficos.

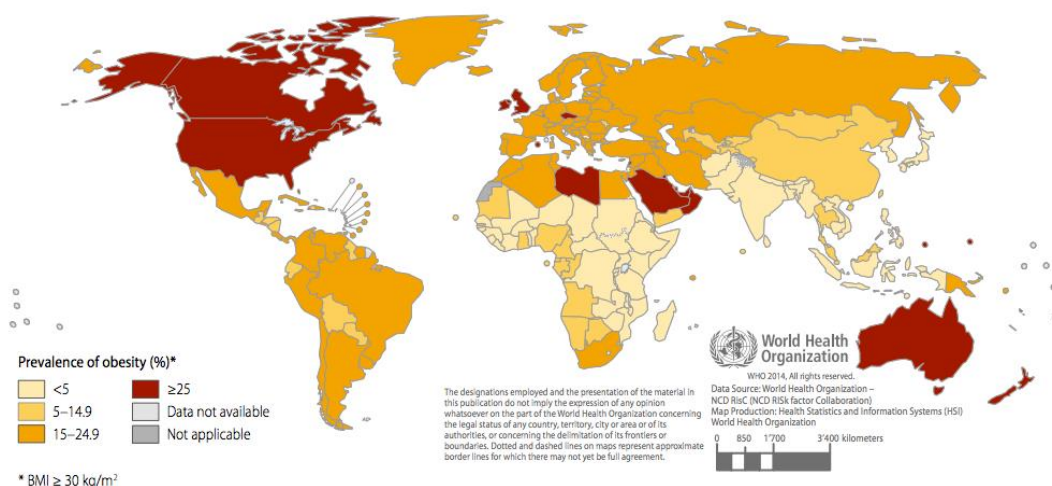


Figura 1. Distribuição da obesidade pelo mundo. Adaptado de GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases, 2014, Organização Mundial da Saúde.

1.2 Inflamação e Obesidade

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 patologias, incluindo resistência à insulina, dislipidemia, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e inflamação, todas estritamente relacionadas com a adiposidade (de Heredia et al, 2012; Glass and Olefsky 2012).

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

As adipocinas 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 PGE₂ (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- κ B (Rakatazi et al, 2004).

No entanto, apesar de vários estudos demonstrarem os mecanismos de produção de citocinas na obesidade o exato impacto da obesidade na susceptibilidade a infecções ainda não está completamente estabelecido.

1.3 Microbiota

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. Estudos recentes demonstraram que tanto humanos como camundongos obesos apresentam uma composição microbiana significativamente diferente dos eutróficos, considerados magros, podendo ela se corresponsabilizar para o surgimento da obesidade (Ley et al, 2005; DiBaise et al, 2008). 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).

Em humanos, a microbiota intestinal é composta de aproximadamente 100 trilhões de bactérias. Esse microbioma 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). 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 um máximo de 10 filos bacterianos na microbiota intestinal humana (Figura 2). 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).

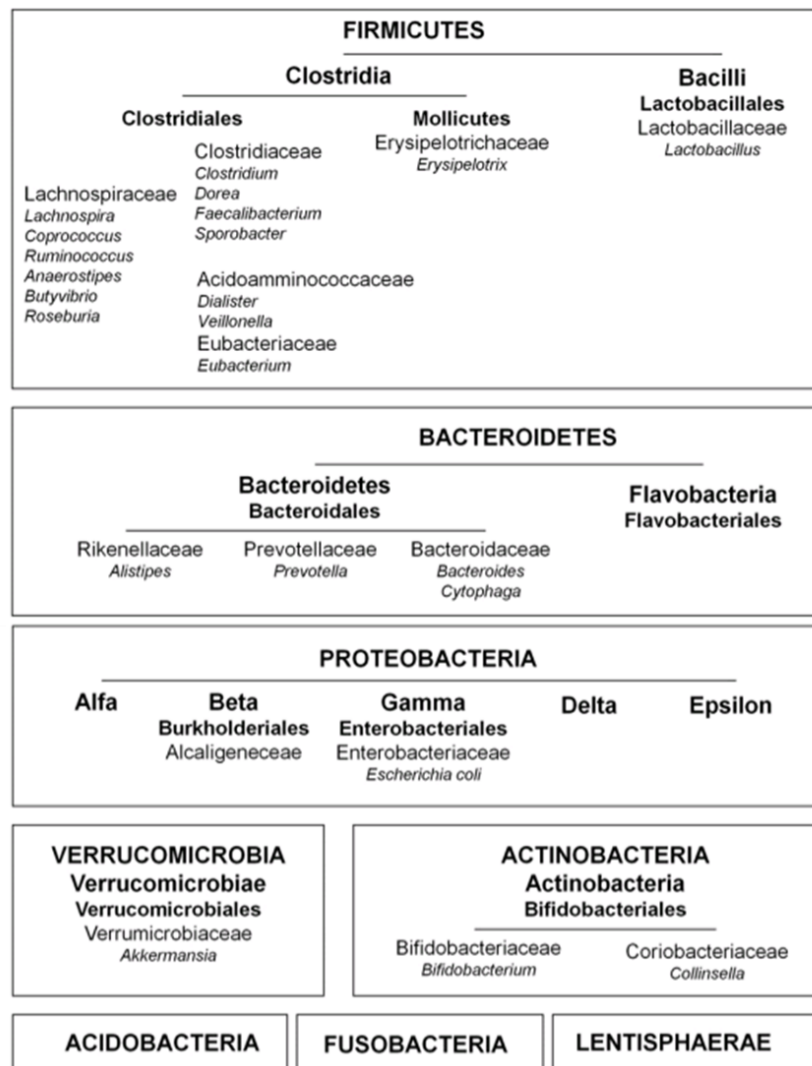


Figura 2. Composição da microbiota intestinal humana. Adaptado de Tagliabue e Elli, 2012.

Atualmente, já se reconhece 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). O desequilíbrio, ou disbiose, da microbiota gera um crescimento bacteriano, com consequente aumento da produção de toxinas e aumento da permeabilidade intestinal. 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 surgimento de uma microbiota transitória. 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).

1.3.1 Microbiota e infecção micobacteriana

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 à 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 C57BL6, 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).

1.4 Tuberculose e infecção bacteriana

A Tuberculose continua sendo um grande problema de saúde global, sendo responsável por comprometer à saúde de milhões de pessoas a cada ano. É uma doença de epidemia global (Figura 3), 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.

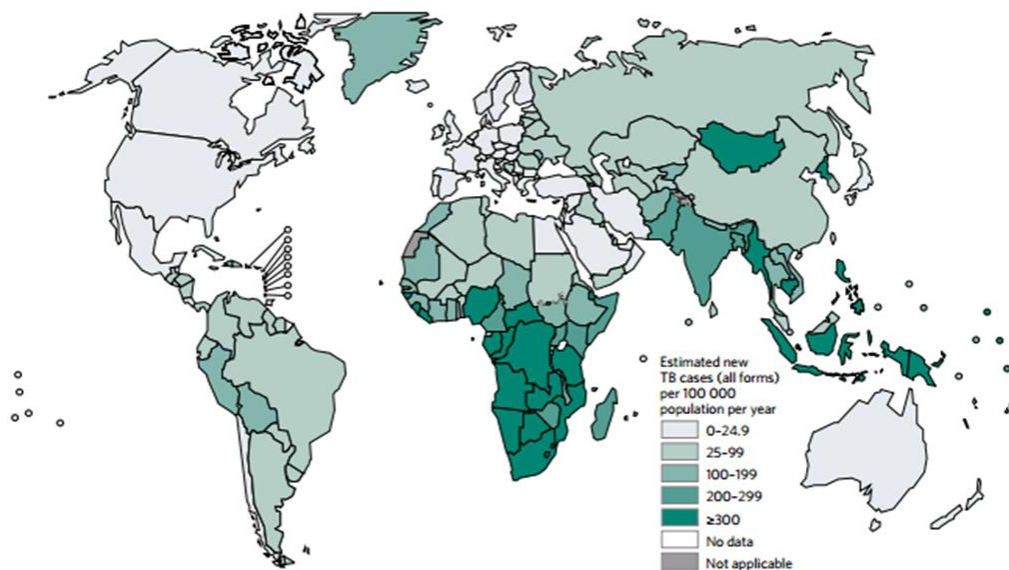


Figura 3. Estimativa de novos casos de Tuberculose ao redor do mundo. Adaptado de GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2016, Organização Mundial da Saúde.

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. Os macrófagos alveolares presentes no pulmão são os primeiros tipos celulares envolvidos na resposta contra a micobactéria (Nguyen and Pieters, 2005). Uma vez dentro do macrófago, a micobactéria reside em um fagossoma. Já é descrito que a micobactéria modifica a maturação deste compartimento fagossomal, a fim de assegurar sua sobrevivência dentro da célula.

A diferenciação de macrófagos em células “espumas” 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.

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).

1.5 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 membrana de 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 único – 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), 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 (Brasaemle et al, 2004).

A biogênese do corpúsculo lipídico se dá a partir do Retículo 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 4) (Murphy, 2001). Quando formados, os corpúsculos lipídicos são suscetíveis a aumentar seu volume, tanto por síntese localizada de lipídios (Kuverschner et al, 2008) como por fusão de corpúsculos (Olofsson et al, 2009).

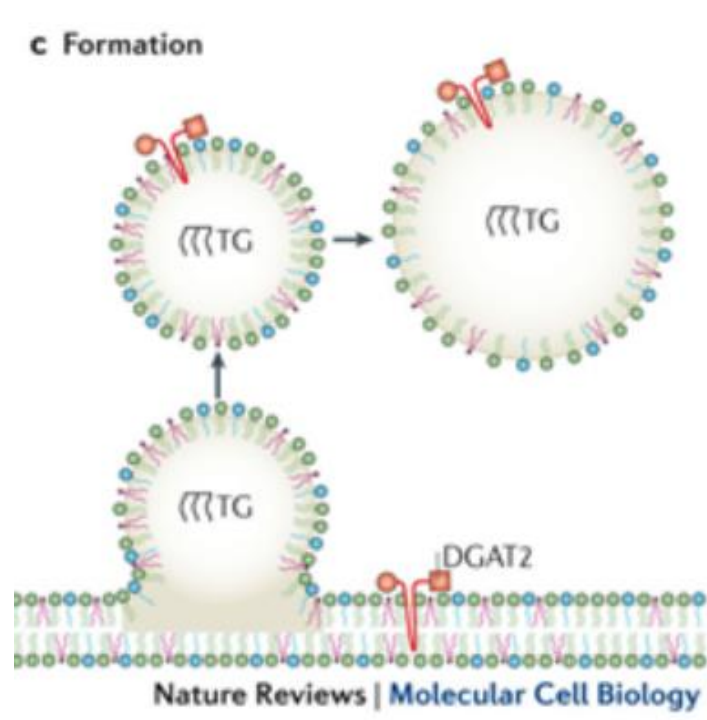


Figura 4. Formação do corpúsculo lipídico. Adaptado de Thiam et al. 2013.

Leucócitos em repouso apresentam alguns poucos corpúsculos lipídicos, porém essas células podem rapidamente estimular a formação de muitos novos (Bozza et al., 2007). O aumento do acúmulo lipídico 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).

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 à presença de

ciclooxigenase (COX), prostaglandina E2 (PGE₂), 5- e 15-lipoxigenase (5-LO e 15-LO) e leucotrieno C4 (LTC₄), todas precursoras de eicosanoides (Figura 5) (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).

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) e CD36 (D'Avila et al, 2006; 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 γ).

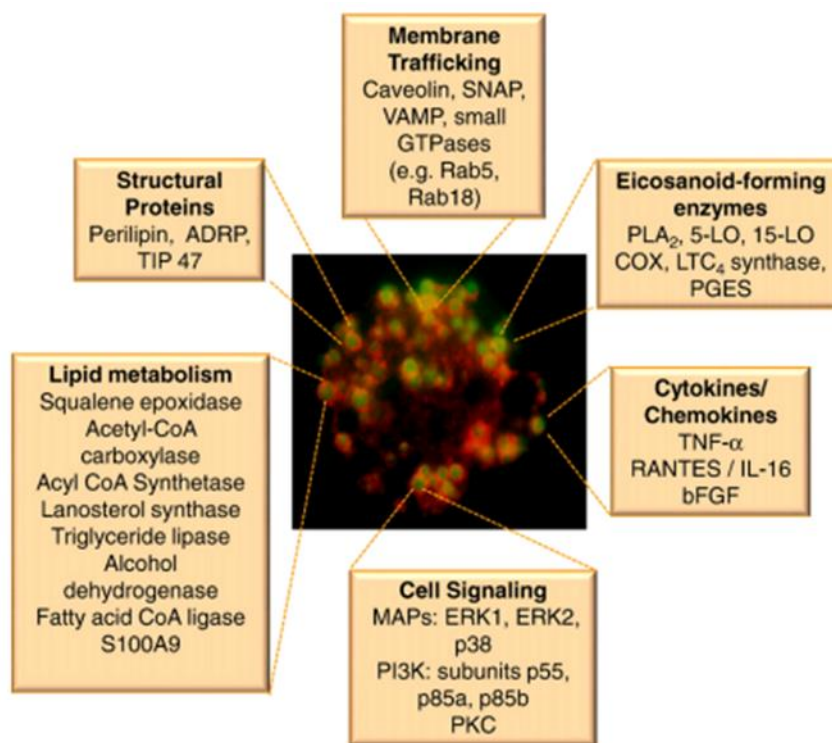


Figura 5. Diferentes marcações em corpúsculo lipídicos. Adaptado de Bozza et al. 2009.

Assim, neste estudo nós utilizaremos 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 funções da microbiota residente e como ela interfere e direciona o sistema imunológico durante infecções micobacterianas em hospedeiros obesos.

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, fornecer 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 o envolvimento da microbiota residente na fisiopatologia da doença e sua interação com o sistema imune em camundongos obesos no modelo de tuberculose experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (I) Avaliar o perfil estrutural da microbiota residente em animais eutróficos e obesos infectados ou não por *M. bovis* BCG;
- (II) Investigar a síntese e secreção de citocinas (IL-10 e KC) nos animais eutróficos e obesos infectados ou não por *M. bovis* BCG,
- (III) Analisar a formação de corpúsculos lipídicos nos animais eutróficos e obesos infectados ou não por *M. bovis* BCG;

2.3 OBJETIVOS FUTUROS

- (I) Investigar a síntese e secreção de citocinas (TNF- α e IL-6) , adipocinas (leptina e adiponectina) e mediadores lipídicos como PGE₂ nos animais eutróficos e obesos infectados ou não por *M. bovis* BCG,
- (II) Analisar o perfil migratório de leucócitos pleurais para a cavidade pleural nos animais eutróficos e obesos infectados ou não por *M. bovis* BCG;
- (III) Comparar a histologia do pulmão e da porção final do intestino nos animais eutróficos e obesos infectados ou não por *M. bovis* BCG;
- (IV) Avaliar o impacto da modulação de PPAR γ sobre a microbiota residente e se esta modulação interfere no curso da infecção por BCG nos animais eutróficos e obesos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fornecidos pelo biotério do centro de biologia da reprodução (CBR) da UFJF. Os animais foram 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. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética/UFJF Protocolo número 028/2016.

3.2 Indução da obesidade

Camundongos C57BL/6 receberam ração hiperlipídica “High Fat” (Tabela 1) (Kennedy et al, 2009). A obesidade foi predita pelo cálculo do Índice de Lee (peso corporal (g)^{1/3}/ comprimento naso-anal (cm) x 1000) e, também, estimada pelo peso das gorduras retro-peritoneal (Andreazzi et al, 2009);

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 x10⁶ bacilos. Os bacilos foram diluídos em PBS estéril e ajustados na concentração de 50 x10⁶ 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;

DIETA HIPERLIPÍDICA (35,2%)	
COMPONENTES	1 kg
Amido de milho	115,5
Amido de milho dextrinizado	132
Caseína	200
Sacarose	100
Banha de porco	312
Celulose microfina	50
Mistura de Vitaminas	10
Mistura de Minerais	35
Óleo de soja	40
L-cistina	3
Bitartarato de colina	2,5
TOTAL (g)	1000

Tabela 1. Protocolo de preparo da ração hiperlipídica.

3.4 Análise da microbiota intestinal

Amostras fecais foram coletadas diariamente para identificar a composição da estrutura microbiana intestinal. 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.

3.5 Pleurisia induzida por BCG

Os animais foram infectados intratoracicamente (IT) com BCG (5×10^6 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 CO₂ 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;

3.7 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). As células da suspensão foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio de campo claro;

3.8 Contagem de corpúsculos lipídicos

Alíquotas da suspensão celular 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 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;

3.9 Dosagem de citocinas

A concentração das citocinas KC e IL-10 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.

3.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) seguido pelo teste t de Student e/ou Anova, com significância de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

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 6).

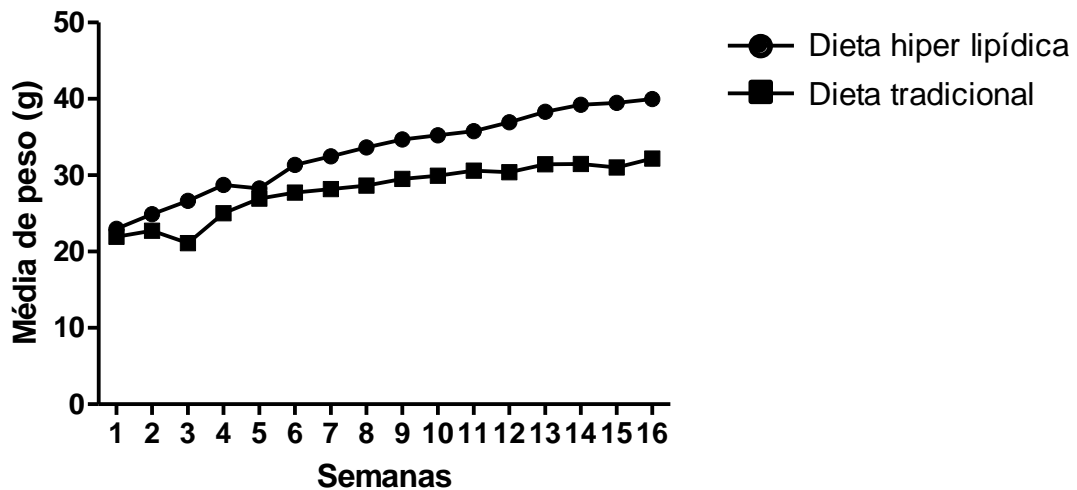


Figura 6. Peso médio dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica. Os animais foram pesados uma vez por semana até completarem as 15 semanas do protocolo de indução de obesidade.

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 7).

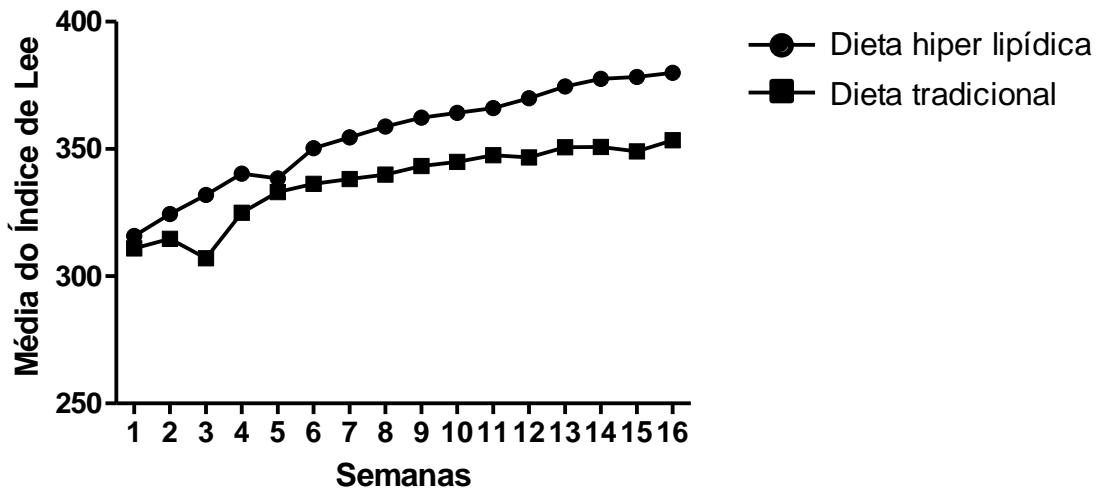


Figura 7. Índice de Lee dos camundongos tratados ou não com dieta hiperlipídica. Média do índice de Lee, calculada com base no peso final de cada camundongo.

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 8, A) e também da razão entre o peso das gorduras e o peso total do animal (Figura 8, B)

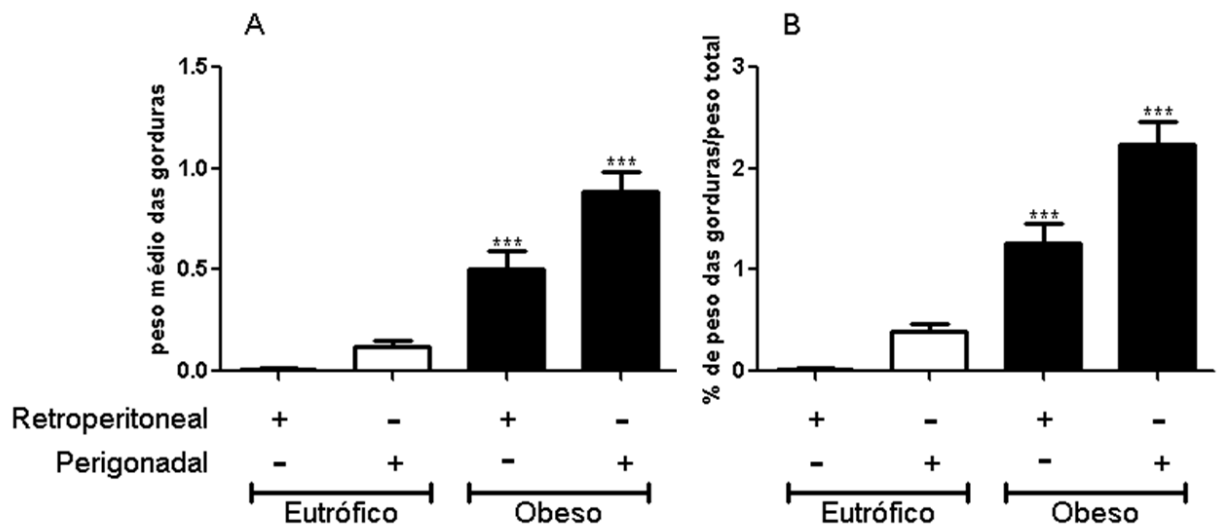


Figura 8. Comparação entre as gorduras retroperitoneal e perigonadal de camundongos eutróficos ou obesos. (A) Peso médio das gorduras e (B) porcentagem relativa entre o peso das

gorduras e o peso total do animal. A diferença significativa entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,001$).

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 9). 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 9).

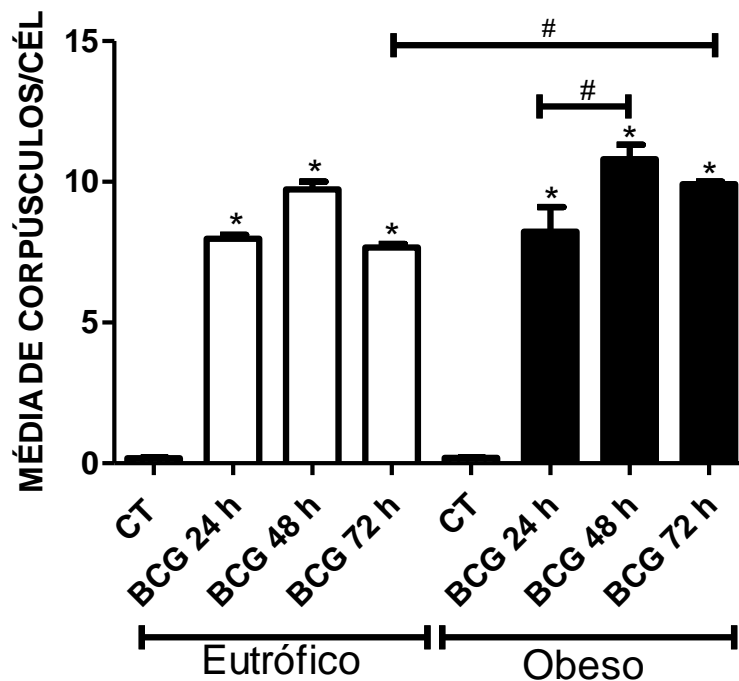


Figura 9. Formação de Corpúsculos Lipídicos nas células do lavado pleural após 24, 48 ou 72 h de infecção por *M. bovis* BCG. Cada barra representa a média, \pm erro padrão de no mínimo 3 animais por grupo. A diferença entre os grupos e seus respectivos controles foi indicada por * ($p < 0,005$). A diferença entre os grupos BCG 24h e BCG 48h Obesos e entre os grupos BCG 72g Eutrófico e BCG 72h Obeso foi indicada por # ($p < 0,005$).

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 10, A). Quanto a IL-10, percebemos que a infecção, na sua fase inicial, induz um aumento em sua síntese quando comparado ao controle (Figura 10, B). Nos camundongos eutróficos, a presença de IL-10 parece decair com o passar da infecção (Figura 10, B). 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 10, B).

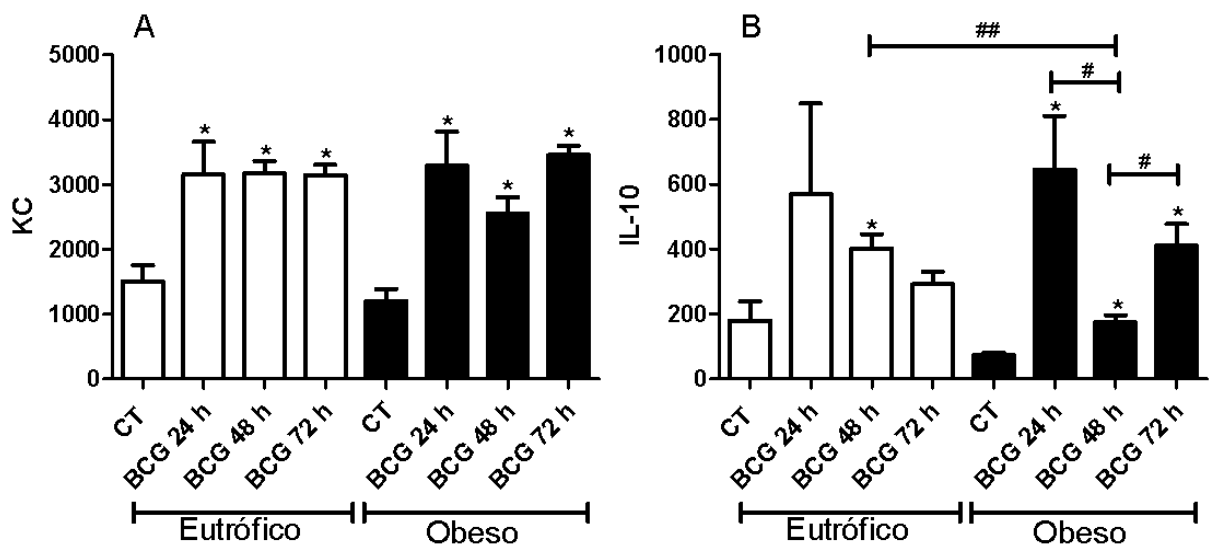


Figura 10: Estudo da síntese de citocinas produzidos por leucócitos pleurais infectados ou não por BCG após 24, 48 e 72 horas de infecção. Análise da síntese (A) KC e (B) IL-10 provenientes de camundongos eutróficos ou obesos. Cada barra representa a média, \pm erro padrão de no mínimo 3 animais por 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 # ($p < 0,005$).

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 11, ●). 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 11, *, # 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 11, * e #) e mudanças mais claras são observadas com 72 horas pós infecção (Figura 11, ^). 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 11, ●)

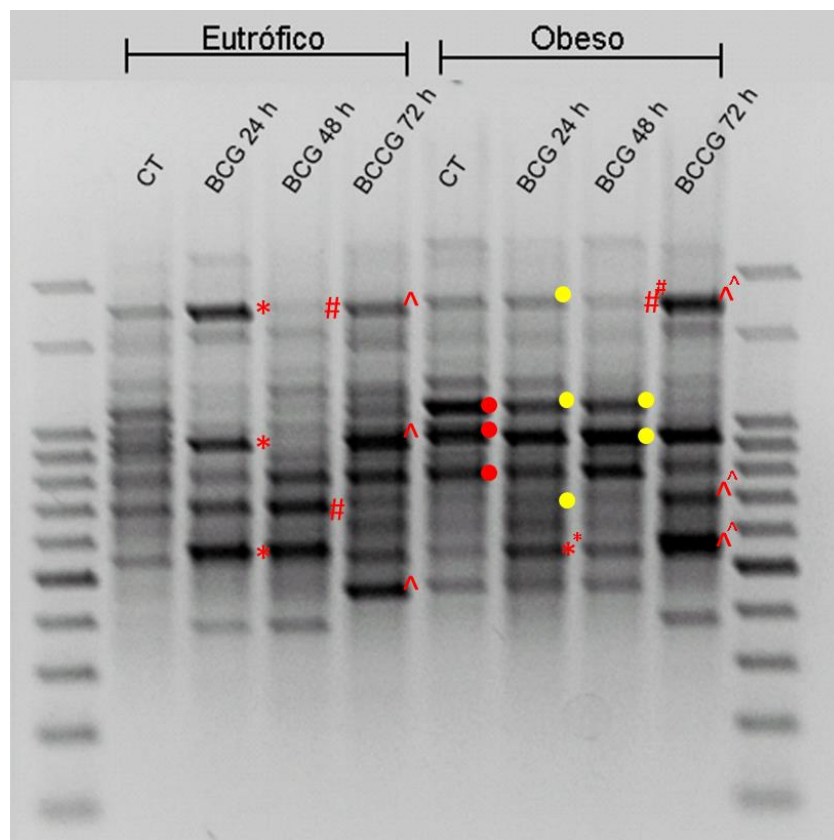


Figura 11. Análise da composição estrutural da microbiota de camundongos eutróficos ou obesos, infectados ou não por *M bovis* BCG.

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 alteração 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- γ , TNF- α e IL-1 α , por exemplo, ambas envolvidas na proteção ao desenvolvimento doença (Cooper and Khader, 2008; Mayer-Barber and Sher, 2015). Enquanto que citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , aumentam a suscetibilidade a TB (Dai and McMurray, 1998; Dorhoi and Kaufmann, 2014; Etna et al. 2014). 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, nossos dados demonstram que os camundongos obesos infectados, apresentaram uma diminuição significativa da síntese de IL-10 no tempo de 48 horas quando comparados aos eutróficos também infectados. Isso sugere que a interação entre a micobactéria e o hospedeiro, está regulando os níveis de IL-10, muito provavelmente para favorecer a sobrevivência do patógeno.

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).

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.

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 na composição 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 colonização 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 PARCIAIS

- Uma associação positiva entre obesidade e TB foi observada;
- 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 modulação da microbiota;
- 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.

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 γ 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.

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.

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.

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.

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.

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.

- 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.
- 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.
- Falagas, M. E., & Kompoti, M. (2006). Obesity and infection. *The Lancet infectious diseases*, 6(7), 438-446.
- Gao, L. Y., & Kwaik, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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. (2009). 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.
- 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 β 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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., Trout, 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.

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.

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.

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.

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).

- 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.
- 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.
- Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H., & van der Meer, J. W. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 294-309.
- 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 LTC₄-synthesizing lipid bodies. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 44:4.
- 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.
- 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.