UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

SANDRA PATRICIA PALMA ALBORNOZ

Obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

Ribeirão Preto
2018

SANDRA PATRICIA PALMA ALBORNOZ

Obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.
Orientadora: Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Palma, Sandra Patricia Albornoz

Obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*; p 137. : Il.; 30 cm

Ribeirão Preto, São Paulo, 2018.

Tese de Doutorado. Apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Bonato, Vânia Luiza Deperon.

Nome: Sandra Patricia Palma Albornoz

Título: **Obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção por *Mycobacterium tuberculosis***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado aos amores de minha vida, meus queridos pais: mamita Fidi (*in memoriam*) e papito Teli (*in memoriam*). Que me acompanharam sempre em cada etapa de minha vida, com seu amor incondicional, com exemplo de vida, honestidade e persistência.

AGRADECIMENTOS

- Essa tese, marcou uma etapa de minha vida, não só por todo o aprendizado que representa para mim, mas pelo logro de culminar satisfatoriamente apesar de ter acontecido a etapa mais difícil de minha vida (a perda de meus pais). Mamita Fidencia e papito Telésforo Rubén, nesse momento vocês não estão presente fisicamente pero sentimentalmente estão sempre em meu coração e meus pensamentos dia a dia. Agradeço a vocês por todo o que me ensinaram para fazer frente aos obstáculos da vida, por nunca render-se e cumprir com os objetivos planejados. As palavras sobram para expressar os maravilhosos e amorosos pais que foram. Gracias papitos!
- À minha orientadora Professora Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato, por ter me recebido no seu laboratório, pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Muito obrigada, Dra. Vânia.
- À Dra. Daniela Carlos, pela colaboração, sugestões, boas discussões e pela disponibilidade.
- Ao Professor Dr. João Santana da Silva, por ter nos acolhido em seu laboratório quando minha orientadora estava em ano sabático na Alemanha, e por todo o aprendizado.
- Aos professores, Dra. Isis do Carmo Kettelhut, Leandra Zambelli Ramalho e Dr. Alceu Afonso Jordão Junior pela disponibilidade e pelas colaborações para o desenvolvimento da tese.
- Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade.

- Aos meus amigos e colegas de laboratório, Ana Flávia, Annie Piñeros, Douglas Santos, Rômulo S. De Oliveira, Tamara Rodrigues e Thaís Bertolini pelos ensinamentos e suporte profissional.
- As técnicas e amigas Izaíra Brandão, Wendy Rios, Ana Masson, Denise Ferraz e Elaine Medeiros, pelo apoio para a realização dos experimentos.
- Aos meus amigos da pós-graduação, que foram parte de minha experiência acadêmica, Amanda Goulart, Gabriela Pesenda, Alynne Karen, Vanessa Maciel.
- Aos amigos que me ajudaram na realização da tese, Camila Manca e Heric Holland.
- À meu irmão Pedro, minha cunhada Carmen, minha sobrinha Claudia e minha tia Nicetas pelo amor, dedicação e compreensão em cada momento de minha vida.
- À Luís Chávez, que acompanhou toda a minha trajetória de doutorado, pelo carinho, paciência, compreensão e apoio incondicional.
- À minha querida amiga Tania Tavares por sua amizade, amor, compreensão, apoio em todo momento já seja triste, alegre e divertido. A vida colocou uma irmã brasileira em minha vida, te adoro.
- Aos meus melhores amigos, Noelia, Iskra, Milagros, José, Karina, Juan Carlos, Henry, Erika, Guisella, Jessica, Fabiola, por seus conselhos, seu carinho, compreensão e pela amizade incondicional. Obrigada meus lindos!
- Aos meus amigos peruanos – Ribeirão, Jenny, Karla, Juan, Priscila, Omar.
- Aos meus amigos e família Brasileira, Jacky Tavares, Rita Padilha, Jose Augusto, Diana e Luana, pela grata convivência.
- À secretária da pós-graduação de Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine, pela atenção e disponibilidade.

- Ao Biotério Central e ao Biotério de Animais Especiais da USP/RP pelo fornecimento de animais de experimentação.
- À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela infraestrutura cedida.
- À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.
- E a todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most inteligente, but the one most responsive to change”

Charles Darwin

Obesidade induzida por dieta hiperlipídica aumenta a inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

RESUMO

A doença infecciosa que causa o maior número de mortes no mundo é a tuberculose, causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Um dos fatores de risco que aumenta três vezes o desenvolvimento de tuberculose é a diabetes, sendo a obesidade associada com predisposição à diabetes. A obesidade gera inflamação de baixo grau que agrava a progressão de doenças crônicas. Estudos que avaliaram a associação da obesidade com tuberculose são controversos, e o tema merece maior investigação. No presente estudo, usamos um modelo experimental para determinar a interface da obesidade e da tuberculose. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta hiperlipídica (HFD – *High Fat Diet*) durante 60 dias, quando foram infectados com *M. tuberculosis* (HFD/Mtb) por via intra-traqueal. Como controles experimentais, animais foram alimentados com dieta padrão (LFD – *Low Fat Diet*) e infectados (LFD/Mtb). Paralelamente, um grupo recebeu HFD e outro LFD, e seguiram sem infecção. Após 30 dias de infecção, totalizando 90 dias de dieta, os diferentes grupos foram avaliados. Os animais obesos e infectados (HFD/Mtb) apresentaram aumento do peso corporal e do peso dos tecidos adiposos, aumento da expressão gênica de IL-1 β no tecido adiposo, intolerância à glicose, deficiência na produção de insulina e aumento dos níveis séricos de IFN- γ comparados aos animais LFD/Mtb. Além disso, o grupo HFD/Mtb foi mais suscetível e apresentou maior inflamação pulmonar comparado ao grupo LFD/Mtb. A inflamação foi caracterizada por aumento na expressão gênica para IL-17, IFN- γ , TNF, IL-1 α , IL-1 β , NLRP3, caspase-1, IL-18, IL-6, aumento de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17 nos pulmões, e foi também acompanhada por aumento de células CD8⁺ e células CD4⁺Foxp3⁺ quando comparado ao grupo LFD/Mtb. Como NLRP3 é uma molécula chave na metainflamação induzida pela obesidade, mas seu papel ainda não está bem definido na tuberculose, animais deficientes de NLRP3 receberam HFD e foram infectados (NLRP3^{-/-} HFD/Mtb). Esse grupo NLRP3^{-/-} HFD/Mtb foi mais resistente e exibiu redução da inflamação pulmonar comparado ao grupo WT (*Wild Type*) HFD/Mtb. Sabendo que a obesidade está associada à disbiose e que produtos bacterianos derivados da dieta alimentar ou da microbiota podem estimular a liberação de IL-1 β pela ativação de NLRP3, avaliamos o papel da microbiota na comorbidade obesidade e tuberculose. Encontramos disbiose intestinal, caracterizada por aumento do Filo Firmicutes e redução dos Filos Bacteroidetes e Proteobacteria, além do aumento de butirato e redução de acetato e propionato nos intestinos do grupo HFD/Mtb comparado ao grupo LFD/Mtb. O aumento na expressão de claudina-2 sugere alteração na permeabilidade intestinal e possível translocação bacteriana, caracterizada pela disbiose nos pulmões, nos quais foi detectado aumento de Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria, e redução de Proteobacteria no grupo HFD/Mtb. Em conclusão, a obesidade aumenta a magnitude da inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis* por um mecanismo dependente de NLRP3. Ambos, aumento da suscetibilidade à infecção e da inflamação pulmonar estão associadas com disbiose intestinal e pulmonar, e aumento da permeabilidade intestinal.

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*, obesidade, inflamação, IL-1 β , IFN- γ , IL-17, NLRP3, microbiota.

Diet-induced obesity increases pulmonary inflammation and susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection.

ABSTRACT

The infectious disease that causes the largest number of deaths in the world is tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. One of the risk factors that increases the development of tuberculosis three times is diabetes. Obesity generates low-grade inflammation that magnifies the progression of chronic disease. Studies that have evaluated the association between obesity and tuberculosis are controversial, and the issue requires further investigation. In this study, we used an experimental model to determine the interface between obesity and tuberculosis. C57BL/6 mice were fed a high-fat diet (HFD) for 60 days and infected by *M. tuberculosis* (HFD/Mtb) via intratracheal. As experimental control, animals were fed a light-fat diet (LFD) and were infected (LFD/Mtb). In parallel, one group was fed with HFD and another LFD, and they remained without infection. After 30 days of diet completing 90 days of feeding, the different groups were evaluated. Obese and infected animals (HFD/Mtb) showed increased body mass and adipose tissue weight, increased of IL-1 β gene expression in adipose tissue, glucose intolerant, impaired insulin production and increased of serum levels of IFN- γ compared to LFD/Mtb animals. In addition to, HFD/Mtb animals were more susceptible and exhibited higher lung inflammation compared to LFD/Mtb animals. The inflammation was characterized by increased of IL-17, IFN- γ , TNF, IL-1 α , IL-1 β , NLRP3, caspase-1, IL-18, IL-6 gene expression and increase of IFN- γ and/ or IL-17-producing CD4⁺ cells in the lungs, and was also accompanied by increased CD8⁺ and CD4⁺Foxp3⁺ cells compared to the LFD/Mtb group. As NLRP3 is a key molecule in obesity-induced meta-inflammation, but its role is still not well defined in tuberculosis, NLRP3 deficient animals fed with HFD and were infected (NLRP3^{-/-} HFD/Mtb). This NLRP3^{-/-} HFD/Mtb group was more resistant and exhibited reduction of lung inflammation compared to the WT (Wild Type) HFD/ Mtb group. Considerate that obesity-associated dysbiosis and that bacterial products derived from diet or microbiota can stimulate the release of IL-1 β by the activation of NLRP3, we evaluated the microbiota role in obesity and tuberculosis comorbidity. We found intestinal dysbiosis characterized by increased Firmicutes phylum and reduction of Bacteroidetes and Proteobacteria phylum, as well as increased butyrate and diminished acetate and propionate in the intestine of the HFD/Mtb group compared to the LFD/Mtb group. An increase of claudin-2 expression suggests an alteration in intestinal permeability and a possible bacterial translocation characterized by dysbiosis in the lungs, with increased of Firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteria and diminished of Proteobacteria in the HFD/Mtb group. In conclusion, obesity increases the magnitude of pulmonary inflammation and susceptibility to *M. tuberculosis* infection by an NLRP3-dependent mechanism. Both increased susceptibility to infection and pulmonary inflammation are associated with intestinal and pulmonary dysbiosis, and increased intestinal permeability.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, obesity, inflammation, IL-1 β , IFN- γ , IL-17, NLRP3, microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Indução de obesidade pela dieta hiperlipídica antes da infecção com <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	38
Figura 2. Manutenção dos parâmetros da obesidade após infecção com <i>M. tuberculosis</i> .	40
Figura 3. Avaliação dos tecidos adiposos após infecção com <i>M. tuberculosis</i> .	42
Figura 4. Avaliação dos níveis séricos de IFN- γ nos animais infectados ou não com <i>M. tuberculosis</i> .	43
Figura 5. Inflamação pulmonar e carga bacteriana dos animais obesos.	46
Figura 6. Expressão de genes da resposta inflamatória e da resposta imune no pulmão dos animais obesos e infectados.	47
Figura 7. Número de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos pulmões dos animais obesos e infectados.	49
Figura 8. Análise de células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17 no pulmão dos animais obesos e infectados.	51
Figura 9. Análise de CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ no pulmão dos animais obesos e infectados.	53
Figura 10. Avaliação das populações de células dendríticas CD11b ⁺ e CD103 ⁺ nos pulmões de animais obesos e infectados.	56
Figura 11. Avaliação de células dendríticas CD11b ⁺ produtoras de IL-6 no pulmão de animais obesos e infectados.	59
Figura 12. Avaliação da capacidade funcional das células dendríticas CD11b ⁺ produtoras de IL-1 β no pulmão de animais obesos e infectados.	61
Figura 13. Avaliação de células dendríticas nos linfonodos dos animais obesos e infectados.	63
Figura 14. Avaliação de macrófagos <i>MI-like</i> nos pulmões de animais obesos e infectados.	66
Figura 15. Avaliação de monócitos e neutrófilos nos pulmões dos animais obesos e infectados.	69
Figura 16. Avaliação dos parâmetros da obesidade nos animais deficientes para NLRP3 antes da infecção com <i>M. tuberculosis</i> .	71
Figura 17. Manutenção dos parâmetros de obesidade nos animais deficientes para NLRP3 após a infecção por <i>M. tuberculosis</i> .	72
Figura 18. Avaliação da carga bacteriana e da inflamação nos pulmões de animais NLRP3 ^{-/-} HFD infectados.	74
Figura 19. Avaliação das células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ nos pulmões de animais NLRP3 ^{-/-} obesos e infectados.	76
Figura 20. Avaliação da microbiota intestinal nos animais obesos e infectados.	78
Figura 21. Dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nos animais obesos e infectados.	79
Figura 22. Avaliação da expressão gênica de proteínas de junção celular no intestino dos animais obesos e infectados.	80
Figura 23. Avaliação da microbiota pulmonar nos animais obesos e infectados.	82
Figura 24. Ilustração representativa dos eventos que acontecem na comorbidade obesidade e tuberculose.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos ingredientes que contem a dieta LFD (a) e HFD (b).....	21
Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	29
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para quantificação de genes em tecido adiposo.....	32
Tabela 4. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para quantificação de genes na microbiota intestinal e pulmonar.....	35
Tabela 5. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para quantificação de genes em intestino (íleo).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

ASC – *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*

DC – *Dendritic cells*

DIO – *Diet induced obesity*

FMO – *Fluorescence minus one*

HFD – *High Fat Diet*

HFD/Mtb – animal obeso e infectados por *M. tuberculosis*

HE – Hematoxilina & Eosina

IFN- γ – *Interferon-gamma*

IMC – Índice de Massa Corpórea

LFD – *Low Fat Diet*

LFD/Mtb – animal não obeso infectado por *M. tuberculosis*

M1 – Macrófagos ativados classicamente

M2 – Macrófagos ativados alternativamente

MDR TB – *Multidrug-Resistant TB*

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

NLRP3 – *Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing, family pyrin domain containing-3*

NF- κ B – *Nuclear factor kappa B*

NOD – *Nucleotide binding Oligomerization-Domain*

PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PMA – *Phorbol 12-Myristate 13 Acetate*

PRR – *Pathogen Recognition Receptors*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

SFA – *Saturated fatty acids*

Th – *T- helper*

TB – Tuberculose

TLR – *Toll-like Receptors*

Treg – T regulatory

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

WHO – *World Health Organization*

WT – *Wild Type*

XDR TB – *Extensively drug resistant TB*

ZO-1 – *Zonula occluden*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais sobre a tuberculose	1
1.2. Resposta imunológica na tuberculose.....	3
1.3. Considerações gerais sobre a obesidade	9
1.4. Obesidade e resposta imunológica	10
1.5. Obesidade e infecções do trato respiratório.....	12
1.6. Considerações gerais sobre microbiota e ativação da resposta imunológica.....	14
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.2. Dieta dos animais	20
3.3. Preparação do inóculo de <i>M. tuberculosis</i>	21
3.4. Infecção intra-traqueal.....	22
3.5. Grupos experimentais de estudo	22
3.6. Parâmetros da obesidade	23
3.6.1. Pesagem semanal dos animais	23
3.6.2. Pesagem dos tecidos adiposos.....	23
3.6.3. Dosagem de glicemia	23
3.6.4. Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (ipGTT, <i>intraperitoneal glucose tolerance test</i>)	23
3.6.5. Dosagem de insulina	24
3.7. Obtenção e digestão do pulmão	24
3.8. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)	24
3.9. Obtenção de células do pulmão e dos linfonodos.....	25
3.9.1. Pulmão	25
3.9.2. Linfonodos.....	25
3.10. Cultura de células do pulmão e linfonodos	26
3.11. Citometria de fluxo (FACS)	26
3.11.1. Marcação extracelular	26
3.11.2. Marcação intracelular fator de transcrição Foxp3	27
3.11.3. Detecção intracelular de citocinas.....	28
3.12. Análise histopatológica	29
3.13. Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR) em tecido adiposo.....	30
3.13.1. Extração de RNA	30
3.13.2. Preparação de DNA complementar	31
3.13.3. Quantificação da expressão de genes.....	31
3.14. Avaliação da expressão gênica pela técnica de <i>PCR Array</i> em pulmão	32
3.14.1. Extração de RNA	32
3.14.2. Síntese de cDNA.....	33
3.14.3. Análise da expressão gênica.....	33
3.15. Análise da microbiota	34

3.15.1. Reação em PCR em Tempo Real	34
3.16. Permeabilidade intestinal	35
3.17. Dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta	36
3.18. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de citocinas no soro.	36
3.19. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Indução de obesidade pela dieta hiperlipídica	38
4.2. Manutenção dos parâmetros da obesidade após a infecção com <i>M. tuberculosis</i>	39
4.3. Avaliação dos tecidos adiposos após infecção com <i>M. tuberculosis</i>	41
4.4. Detecção de IFN- γ no soro dos animais infectados ou não com <i>M. tuberculosis</i>	43
4.5. Inflamação pulmonar e número de bacilos nos animais obesos	44
4.6. Perfil de expressão de genes da resposta inflamatória e da resposta imune nos pulmões dos animais obesos e infectados	46
4.7. Número de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no pulmão dos animais obesos e infectados	48
4.8. Análise de células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17 no pulmão dos animais obesos e infectados	50
4.9. Análise de CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ no pulmão dos animais obesos e infectados.....	52
4.10. Avaliação das populações de células dendríticas CD11b ⁺ e CD103 ⁺ nos pulmões de animais obesos e infectados	54
4.11. Avaliação da capacidade funcional das células dendríticas CD11b ⁺ produtoras de IL-6 no pulmão de animais obesos e infectados.....	57
4.12. Avaliação de células dendríticas CD11b ⁺ produtoras de IL-1 β no pulmão de animais obesos e infectados	59
4.13. Avaliação de células dendríticas nos linfonodos dos animais obesos e infectados....	61
4.14. Avaliação de macrófagos <i>MI-like</i> nos pulmões de animais obesos e infectados	64
4.15. Avaliação de monócitos e neutrófilos nos pulmões dos animais obesos e infectados	67
4.16. Avaliação dos parâmetros da obesidade nos animais deficientes para NLRP3 antes e após a infecção com <i>M. tuberculosis</i>	69
4.17. Avaliação da carga bacteriana e da inflamação nos pulmões de animais NLRP3 ^{-/-} HFD infectados	73
4.18. Avaliação das células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ nos pulmões de animais NLRP3 ^{-/-} obesos e infectados	75
4.19. Avaliação da microbiota intestinal nos animais obesos e infectados.....	77
4.20. Dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nos animais obesos e infectados	78
4.21. Avaliação da expressão de proteínas de junção celular no intestino dos animais obesos e infectados	79
4.22. Avaliação da microbiota pulmonar nos animais obesos e infectados.....	81
5. DISCUSSÃO	83
6. SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	98
7. CONCLUSÃO.....	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXOS.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre a tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que foi descoberto pelo pesquisador Robert Koch em 1882 (Koch 1982, O'Garra, Redford et al. 2013). O bacilo *M. tuberculosis* é uma bactéria aeróbica, ácido álcool resistente, transmitida através da inalação de gotas de saliva ou aerossóis contaminados (Peddireddy, Doddam et al. 2017, Torrelles and Schlesinger 2017). A TB é uma doença predominantemente pulmonar, mas pode atacar outros órgãos, como os rins, os ossos, o intestino e os gânglios linfáticos (O'Garra, Redford et al. 2013). Embora existam aproximadamente 2 bilhões de pessoas infectadas com *M. tuberculosis*, 90 a 95% têm TB latente (assintomática) e 5% a 10% desenvolvem TB ativa, caracterizada por sintomas como tosse com expectoração por mais de 15 dias, presença de sangue no escarro, febre, fadiga, intensos suores noturnos e perda de peso (Pai, Behr et al. 2016, Cadena, Fortune et al. 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, *World Health Organization*), em 2016 houve 10,4 milhões de novos casos de TB e 1,7 milhões de vítimas fatais no mundo (WHO 2018). No Brasil, a doença constitui um problema de saúde pública e, em 2016, foram notificados 66,7 mil novos casos (Brasil 2017). Embora, entre 2006 a 2015 tenha ocorrido diminuição da taxa de mortalidade no Brasil, em 2015 foram registrados 4,543 mil óbitos por TB (Brasil 2017).

Com o surgimento da AIDS (AIDS- *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), o número de casos de TB aumentou consideravelmente como consequência da imunossupressão provocada por esta síndrome. Em 2016, 1 milhão de pacientes com TB estavam coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) (Cadena, Fortune et al. 2017, WHO 2017). A AIDS é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de TB, embora a desnutrição, hábitos de vida desregrados e doenças, como diabetes, também constituam fatores de risco associados a doença (WHO, 2018).

O diagnóstico mais rápido da infecção é realizado por microscopia do escarro ou baciloscopia, pela coloração com Ziehl-Neelsen que, embora seja uma técnica específica, possui baixa sensibilidade. Dessa forma, existe a necessidade de confirmação da presença de bactérias por meio de cultura, que é mais sensível, porém, mais demorada, podendo levar até 6 semanas (Ryu 2015).

Na atualidade, não existe uma vacina efetiva para controlar e combater a TB. A vacina BCG (Bacilo de *Calmette-Guérin*), elaborada a partir de uma bactéria atenuada que causa a doença em bovinos (*Mycobacterium bovis*), previne a doença na infância, mas apresenta eficácia extremamente variada em adultos (Dheda, Barry et al. 2016).

O tratamento para TB pulmonar é de, no mínimo 6 meses e, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças Transmissíveis (CDC, *Center for Disease Control and Prevention*), as drogas de primeira linha administradas são: Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida. O tratamento deve ser continuado e concluído mesmo após o desaparecimento dos sintomas, a fim de garantir a correta eliminação do bacilo (CDC 2016). Quando o tratamento é abandonado, muitos pacientes desenvolvem TB multidroga-resistente (MDR TB, *multidrug-resistant TB*), podendo ocorrer também TB extremamente resistente a drogas (XDR TB, *extensively drug-resistant TB*), que é mais difícil de ser tratada, e por isso, frequentemente fatal (CDC 2016, Dheda, Barry et al. 2016).

Diante disso há a necessidade de melhorar o diagnóstico e desenvolver novos medicamentos, bem como entender melhor a resposta imunológica envolvida na proteção para ajudar no desenvolvimento de novas vacinas e imunoterapias. Além disso, as comorbidades, como no caso da TB e diabetes requerem atenção e cuidados mais complexos, uma vez que os fármacos usados para tratar a tuberculose podem interagir com o metabolismo dos fármacos usados para tratar diabetes, o que pode levar a um controle glicêmico inadequado (Dooley and Chaisson 2009).

1.2. Resposta imunológica na tuberculose

A resposta imunológica inata durante a infecção é mediada, principalmente, por macrófagos alveolares e neutrófilos, além de células dendríticas (DCs, *Dendritic Cells*) e monócitos, que são as primeiras células a entrarem em contato com o bacilo (O'Garra, Redford et al. 2013, Weiss and Schaible 2015).

Os macrófagos e as DCs identificam os bacilos por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRR, *Pathogen Recognition Receptors*) que interagem com PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) da bactéria (Weiss and Schaible 2015). Dentre os PRR que participam da resposta imunológica na infecção por *M. tuberculosis in vivo*, destacam-se os *Toll-Like Receptors* (TLR), tais como TLR2, TLR4 e TLR9 (Bafica, Scanga et al. 2005, Scriba, Coussens et al. 2016). A cooperação entre TLR2 e TLR4 desempenha um papel crítico na apoptose de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* (Sánchez, Rojas et al. 2010). TLR9 possui papel importante na regulação da resposta Th1 *in vivo*, contribuindo para resistência do hospedeiro (Bafica, Scanga et al. 2005). Além dos TLR, receptores NOD2 (*Nucleotide binding Oligomerization-Domain*) interagem com PAMPs, resultando na transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, TNF, quimiocinas, além da secreção de IL-12 (Scriba, Coussens et al. 2016).

Outro PRR que participa da resposta contra *M. tuberculosis* é NLRP3 (*Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3*) que induz a síntese da citocina pró-inflamatória IL-1 β , importante na defesa do hospedeiro contra *M. tuberculosis* (Dorhoi, Nouailles et al. 2012, Latz, Xiao et al. 2013). Camundongos deficientes em IL-1R (receptor de IL-1) ou na expressão de IL-1 β foram susceptíveis à infecção com *M. tuberculosis* (Mayer-Barber, Barber et al. 2010). Estudos *in vitro* também mostraram que macrófagos, diferenciados a partir da linhagem de monócitos THP-1, infectados com *M. tuberculosis* ativaram NLRP3, caspase 1 e subsequentemente, a produção de IL-1 β (Mishra, Moura-Alves et al. 2010). O mesmo grupo, em 2013, mostrou que na infecção de animais com *M. tuberculosis*, o aumento de IFN- γ nos pulmões aumentava os níveis de óxido nítrico regulando negativamente o inflamassoma NLRP3 e diminuindo a produção de IL-1 β (Mishra, Rathinam et al. 2013) (Briken, Ahlbrand et al. 2013). No entanto, Dorhoi e colaboradores observaram que os

animais deficientes em NLRP3 infectados por *M. tuberculosis* controlaram a infecção, sendo a produção de IL-1 β independente de NLRP3. Esses resultados mostraram que NLRP3 não afetou a progressão da TB *in vivo* (Dorhoi, Nouailles et al. 2012). Em estudo recente, Lou e colaboradores descreveram que NLRP3 pode ser inibido pelo micro RNA miR-20b resultando em redução da inflamação pulmonar animais infectados com *M. tuberculosis* (Lou, Wang et al. 2017). Esses estudos mostram que o papel de NLRP3 na resposta contra *M. tuberculosis* não está bem esclarecido ainda.

Além da IL-1 β , IL-12, IL-1 α , IL-6, TNF e IFN- γ estão relacionadas ao controle da infecção (Flynn, Chan et al. 1993, Flynn, Goldstein et al. 1995, Cooper, Magram et al. 1997, Mayer-Barber, Andrade et al. 2011), enquanto IL-4, IL-10 e TGF- β estão associadas com a progressão da mesma (Hernandez-Pando, Orozco et al. 2009, Morais Fonseca, Rosada et al. 2010, Redford, Murray et al. 2011).

Durante a infecção, ao menos duas populações de macrófagos estão envolvidas na resposta imunológica. Os macrófagos classicamente ativados (M1) são induzidos por IFN- γ e estão associados com a expressão de iNOS (*Inducible Oxide Nitric Syntase*), a secreção de citocinas pró-inflamatórias e com o perfil Th1 (Huang, Luo et al. 2015). Os macrófagos alternativamente ativados (M2) estão associados com um perfil anti-inflamatório, e diferenciam-se em resposta às citocinas Th2 e têm função de promover reparo tecidual (Sica and Mantovani 2012). Além disso, um estudo *in vitro*, mostrou que a polarização de macrófagos participa na formação e desenvolvimento do granuloma, assim, durante uma infecção de células mononucleares de sangue periférico com *M. tuberculosis*, os macrófagos M1 aos três dias de infecção aumentam e promovem a formação do granuloma, enquanto aos 9 dias de infecção decresce os marcadores para M1 e aumenta M2, observando-se formação de granulomas necróticos e não necróticos (Huang, Luo et al. 2015).

As DCs desempenham papel essencial na infecção contra *M. tuberculosis*. Nos pulmões dos camundongos infectados com *M. tuberculosis* ocorrem duas populações de DC convencionais (cDCs) migratórias, CD103⁺ e CD11b⁺, que atuam na polarização de células T CD4⁺ (Lai, Jeyanathan et al. 2018). Ambas as populações de DCs expressam altos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II, *Major Histocompatibility Complex class II*), moléculas coestimuladoras, como CD80 e

CD86, assim como outros marcadores associados com apresentação do antígeno (CD40, CD70, CD83 e PD-L2) e ausência de marcadores das linhagens de células T, B e NK (Mayer-Barber and Barber 2015, Macri, Pang et al. 2017). Além disso, as DCs têm papel importante no recrutamento de células para o sítio da infecção pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1, IL-6 e TNF (Mihret 2012).

A população de DCs $CD103^+$, identificada como $CD11c^+CD11b^-CD103^+$, está associada à apresentação cruzada de antígenos às células T $CD8^+$ e à resposta Th1. Entretanto, a população de DCs $CD11b^+$, caracterizada como $CD11c^+CD11b^+CD103^-$, está associada à resposta Th2 e às células T de memória (Mildner and Jung 2014). Resultados do nosso grupo corroboram com esses dados, pois mostraram que as DCs $CD103^+$ no pulmão de camundongos infectados com *M. tuberculosis* aumentaram a frequência de células T $CD4^+$ produtoras de IFN- γ ou IL-17 (Sérgio, Bertolini et al. 2015). Do contrário ao que já foi descrito para as funções clássicas das populações de DCs, Lai e colaboradores mostraram que as células $CD11b^+$, e não as $CD103^+$, migram para os nódulos linfáticos do pulmão dos animais infectados com *M. tuberculosis* e induzem a polarização de células Th1, sendo as células $CD103^+$ associadas com a produção de IL-10 (Lai, Jeyanathan et al. 2018). Esses trabalhos mostram que ainda não está claro o papel das populações de DCs na infecção por *M. tuberculosis*.

As DCs convencionais ainda podem ser classificadas em cDC1 e cDC2. Em camundongos, as cDC1 correspondem às DCs $CD8^+$ e incluem as $CD103^+$ presentes nos tecidos não linfoides e nos nódulos linfáticos, e representam 20% de DCs no baço. São associadas com apresentação cruzada de antígenos e ativação de células T $CD8^+$. Entretanto, as cDC2 correspondem às DCs $CD8^-$ e incluem as $CD11b^+$, e representam 80% de DCs no baço, estando também presentes no timo, nódulos linfáticos e tecidos não linfoides (Merad, Sathe et al. 2013, Macri, Pang et al. 2017).

Como já descrito, após a ativação da imunidade inata, as DCs migram para os linfonodos presentes na região do mediastino e induzem ativação da imunidade adaptativa por meio da resposta de células T específicas contra antígenos da micobactéria. As células $CD4^+$ Th1, produtoras de IFN- γ , estimulam a diferenciação de macrófagos M1, que exercem funções microbicidas, por meio da produção de enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) e de

nitrogênio (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) (Sica and Mantovani 2012). O IFN- γ é uma das primeiras citocinas descritas como protetoras na TB (Cooper, Dalton et al. 1993, Flynn, Chan et al. 1993). Flynn e colaboradores mostraram que animais deficientes em IFN- γ infectados com *M. tuberculosis*, embora tenham desenvolvido granuloma no pulmão, foram altamente suscetíveis à infecção (Flynn, Chan et al. 1993). Cooper e colaboradores mostraram que camundongos deficientes de IFN- γ , quando infectados via aerossol ou via intravenosa, sucumbiram à infecção, e apresentaram aumento da carga bacteriana e necrose pulmonar (Cooper, Dalton et al. 1993). O IFN- γ principalmente é produzida pelas células CD4⁺, mas pode também ser produzida por outras células: CD8, NK, células T $\gamma\delta$ que colaboram na resposta imune adaptativa durante na infecção por micobactérias virulentas (Cooper, Mayer-Barber et al. 2011).

Diante dos estudos, o IFN- γ é considerado o principal marcador imunológico de proteção contra TB. No entanto, o aumento da inflamação pode promover o desenvolvimento de lesões destrutivas no pulmão, o que é deletério para o hospedeiro (Orme, Robinson et al. 2015). O estudo *in vivo* reportado por Sakai e colaboradores mostrou que apenas 30% das células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ conferiam redução da carga bacilar no pulmão de animais infectados com *M. tuberculosis* e, quando a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ aumentava duas vezes, ocorria exacerbação da infecção pulmonar levando à morte do hospedeiro (Sakai, Kauffman et al. 2016). Assim, a produção de IFN- γ produzidas pelas células T CD4⁺ podem tem um papel protetor e patológico dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. Kumar e colaboradores, sugerem que pessoas adultas imunocompetentes após exposição da infecção por *M. tuberculosis* podem ter uma balanceada produção de CD4⁺ produtoras IFN- γ que contem a disseminação do bacilo (fase latente), determinando um papel protetor contra à infecção. No entanto, pessoas jovens ou imunodeficientes infectadas com *M. tuberculosis* podem tem uma resposta hipoativa na produção de CD4⁺ produtoras IFN- γ desenvolvendo uma tuberculose primária. Além disso, pessoas imunocompetentes ou pacientes com HIV que desenvolvem o síndrome de reconstituição imunológica após tratamento com antirretrovirais podem ter uma resposta hiperativa da produção de IFN- γ . Ambas respostas (hipoativa ou hiperativa) conduziriam acrescentar a imunopatologia

(Kumar 2017). A citocina IFN- γ também cumpre um papel na manutenção dos granulomas, estabelecendo a fase da latência (Sasindran and Torrelles 2011). Com a indução da resposta inflamatória e persistência de antígenos, surgem a formação dos granulomas que permitem manter os bacilos em um microambiente delimitado, evitando sua disseminação (Nunes-Alves, Booty et al. 2014). O granuloma é uma estrutura organizada constituída por macrófagos, neutrófilos, monócitos, células epitelióides, células gigantes multinucleadas, DCs que formam um núcleo central necrótico onde mantem aos bacilos, que está rodeado por células B, células T e fibroblastos (Sasindran and Torrelles 2011, O'Garra, Redford et al. 2013). Nesta fase de latência, as pessoas imunocompetentes controlam a infecção sem desenvolver sintomas clínicos e apresentando granulomas de menor tamanho e compactas com presença de um aumento de células T CD4 produtoras de IFN- γ , no entanto, quando as pessoas estão imunodeprimidos ocorre uma infecção crônica, a necrose nos granulomas aumenta a quantidade de bacilos no meio extracelular, permitindo a disseminação pelas vias aéreas (Shaler, Horvath et al. 2013).

Além das células Th1 produtoras de IFN- γ , nos pulmões de indivíduos com TB e de camundongos infectados também são detectadas as citocinas IL-4, IL-17, IL-10 (Torrado and Cooper 2010, Redford, Murray et al. 2011). As células T CD4⁺ de padrão Th2, que secretam IL-4, IL-5 e IL-13, promovem a diferenciação de macrófagos M2, estão associadas com suscetibilidade à infecção e encontram-se exacerbadas em pacientes com TB ativa (Somoskövi, Zissel et al. 1999, Seah, Scott et al. 2000, van Crevel, Karyadi et al. 2000). Além disso, atuam no controle da inflamação, uma vez que reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , e promovem o reparo tecidual (Martinez, Helming et al. 2009, Sica and Mantovani 2012). Em adição, prejudicam a imunidade contra patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis* (Kahnert, Seiler et al. 2006, El Kasmi, Qualls et al. 2008, Tomioka, Tatano et al. 2012). No entanto, um estudo recente do nosso grupo mostrou que macrófagos M2 induzidos por IL-33, quando inseridos em um microambiente onde ocorre a presença de IFN- γ , atenuam o crescimento dos bacilos e a inflamação pulmonar (Piñeros, Campos et al. 2017).

Com relação às células Th17, essa população contribui para o recrutamento de linfócitos CD4⁺ de perfil Th1 para os pulmões de animais infectados com *M. tuberculosis*

(Khader and Cooper 2008) e, portanto, parecem estar associadas com a proteção na infecção. Resultados do nosso grupo também sugerem que as células Th17 exercem papel protetor na TB, uma vez que a imunização com BCG seguida de imunização com proteínas de filtrado de cultura de *M. tuberculosis* e CpG aumentou os níveis de IFN- γ e IL-17, e causou diminuição da carga bacilar (da Fonseca, Silva et al. 2009). Porém, quando em excesso, as células Th17 podem induzir lesão tecidual, em decorrência do acúmulo de neutrófilos e de células Th1, produção de ROS, NO, enzimas proteolíticas e indução de necrose (Torrado and Cooper 2010). Além disso, em pacientes com TB, as células Th17 estão associadas com o desenvolvimento da doença (Lyadova and Panteleev 2015). Jurado e colaboradores mostraram que células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e de IL-17 no sangue periférico de pacientes com TB estão diretamente associadas com a gravidade da doença (Jurado, Pasquinelli et al. 2012). Deste modo, esses estudos mostram que IL-17 e IFN- γ são importantes na proteção contra TB, porém, o aumento dessas citocinas podem induzir dano pulmonar e progressão da doença.

Por fim, o principal mecanismo regulador para suprimir a resposta inflamatória na TB foi atribuído às células T reguladoras (Treg). Três estudos clássicos em TB humana mostraram aumento das Treg CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺Foxp3⁺ no sangue periférico, associando com progressão da TB (Guyot-Revol, Innes et al. 2006, Ribeiro-Rodrigues, Resende Co et al. 2006, Chen, Zhou et al. 2007). Estudos experimentais mostraram que a depleção de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ durante uma infecção com *M. tuberculosis* foi eficiente para reduzir o crescimento de bacilos nos pulmões (Scott-Browne, Shafiani et al. 2007). Outro estudo mostrou que a expansão das células Treg resultou em atraso no influxo de células T CD4⁺ e T CD8⁺ efetoras para o pulmão dos animais infectados, prolongando a expansão bacteriana na fase inicial da infecção (Shafiani, Tucker-Heard et al. 2010). Nosso grupo mostrou uma associação das células Tregs com o maior carga bacteriana e com *background* genético, pois animais BALB/c infectados com *M. tuberculosis* apresentaram menor resposta Th1 e Th17, maior carga bacilar no pulmão e mais células Treg supressoras quando comparados com animais C57BL/6 infectados.

Em síntese, a persistência dos antígenos da micobactéria causa inflamação crônica mediada, principalmente, por células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17. Nesse

contexto, é necessário compreender como fatores genéticos, metabólicos e ambientais podem influenciar o cenário da resposta inflamatória.

1.3. Considerações gerais sobre a obesidade

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal que resulta em risco à saúde (González-Muniesa, Martínez-González et al. 2017). Nos últimos anos, o índice de obesidade aumentou e, segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2016 houve mais de 1,9 bilhões de pessoas com sobrepeso e 650 milhões foram consideradas obesas (WHO 2018). No Brasil, a obesidade aumentou 60% em 10 anos, e a prevalência passou de 11,8% para 18,9 % em 2016 (Brasil 2017).

Muitos fatores podem influenciar o desenvolvimento da obesidade, como fatores ambientais (mudanças de temperatura, ausência do sono), fatores genéticos, qualidade da dieta, atividades físicas, alterações na microbiota intestinal, fatores endócrinos, que conduzem à maior ingestão de alimentos e deposição de gordura (González-Muniesa, Martínez-González et al. 2017). Os indivíduos obesos podem desenvolver doenças metabólicas, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, aterosclerose, alguns tipos de câncer e doenças respiratórias (Larsson and Wolk 2007, Kanneganti and Dixit 2012, Mancuso 2013, González-Muniesa, Martínez-González et al. 2017).

A obesidade está associada com uma inflamação de baixo grau denominada metainflamação, acompanhada da produção de citocinas próinflamatórias como IL-1 β , TNF e IL-6 que contribuem para a resistência à insulina e para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Lumeng 2013, Mancuso 2013). Além disso, a obesidade está associada com a intolerância à glicose, aumento de adipocinas próinflamatórias, como leptina e resistina, e diminuição de adipocinas anti-inflamatórias, como adiponectina (Osborn and Olefsky 2012, Lumeng 2013, Pereira and Alvarez-Leite 2014).

O tecido adiposo pode ser constituído por tecido branco e marrom, que são as duas formas importantes para responder frente às mudanças no balanço energético sistêmico. O tecido adiposo branco é o mais abundante. Tem a função de armazenar e manter a homeostase da energia e está localizado nos depósitos de gordura subcutânea e visceral. O tecido marrom tem a função de converter a energia a partir dos alimentos em energia térmica corporal e está localizado na região escapular (González-Muniesa,

Martínez-González et al. 2017). O tecido adiposo bege é um tipo de tecido branco localizado nas regiões interescapular, axilar, cervical e supraclavicular, participando da termogênese frente as condições de baixas temperaturas (Kwok, Lam et al. 2016)

O tecido adiposo visceral está localizado em torno de órgãos vitais dentro do peritônio, e é constituído por adipócitos e leucócitos. Na condição de obesidade, o tecido adiposo pode constituir até 50% da massa corporal. Os depósitos de gordura contêm de 2 a 5 milhões de células, das quais 65% são constituídas por leucócitos (macrófagos, células T, células B, células NK e mastócitos) (Kanneganti and Dixit 2012, Kwok, Lam et al. 2016). Estima-se o acúmulo de 20 a 30 milhões de macrófagos por cada quilograma de excesso de gordura (Weisberg, McCann et al. 2003, Lumeng and Saltiel 2011). Os macrófagos M1 são caracterizados como as principais células da metainflamação induzida pela obesidade. A produção de TNF, IL-6, IL-12 e IL-1 β , além da produção de ROS e a expressão de iNOS nos macrófagos M1 contribuem para indução da resistência à insulina (Lumeng, Bodzin et al. 2007, Fujisaka, Usui et al. 2009, Osborn and Olefsky 2012). Entretanto, os macrófagos M2 localizam-se no tecido adiposo magro e estão associados ao remodelamento, ao reparo tecidual, a sensibilidade à insulina e à resolução da inflamação (Ouchi, Parker et al. 2011). Dessa forma, durante a obesidade, macrófagos M1, TNF, IL-6, IL-12 e IL-1 β , NO e ROS contribuem para desencadear a síndrome metabólica.

1.4. Obesidade e resposta imunológica

Como a habilidade dos adipócitos em expandir e estocar lipídios é limitada, a lipogênese é contínua em resposta ao excesso de calorias, resultando na geração de DAMPs (*Danger Associated Molecular Patterns*), como as ceramidas, o ATP e o ácido úrico. Esses dois últimos, liberados a partir de células mortas, podem ativar NLRP3, que atua como um dos receptores que iniciam a inflamação no tecido adiposo (Franchi, Muñoz-Planillo et al. 2010, Kanneganti and Dixit 2012).

O NLRP3 desempenha um papel importante na patogênese da obesidade e na resistência à insulina (Vandanmagsar, Youm et al. 2011). O grupo de Vandanmagsar e colaboradores mostrou que animais alimentados com dieta hiperlipídica (HDF, *High Fat Diet*) apresentaram aumento da expressão de NLRP3 e de IL-1 β no tecido adiposo

acompanhada de um aumento dos níveis de glicemia no sangue (Vandanmagsar, Youm et al. 2011). Stienstra e colaboradores descreveram que camundongos deficientes de NLRP3 ou de caspase-1 foram resistentes ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta HFD e apresentaram redução no tamanho dos adipócitos e no infiltrado de macrófagos no tecido adiposo (Stienstra, van Diepen et al. 2011). Entretanto, Kim e colaboradores descreveram que animais deficientes de NLRP3 alimentados com dieta HFD tiveram aumento de peso e foram mais sensíveis ao desenvolvimento de asma, acompanhada por aumento de células linfóides inatas produtoras de IL-17 (Kim, Lee et al. 2014).

Adolescentes e mulheres obesas apresentam maior expressão de NLRP3 no tecido adiposo subcutâneo comparados a pessoas magras (Yin, Deng et al. 2014, Kursawe, Dixit et al. 2016). Quando pessoas obesas com diabetes do tipo 2 foram submetidas à restrição calórica e apresentaram perda de peso, houve redução na expressão de NLRP3 e de IL-1 β no tecido adiposo subcutâneo, diminuição da intolerância à glicose e aumento da sensibilidade à insulina (Vandanmagsar, Youm et al. 2011). Esses estudos confirmam que o tecido adiposo na condição de obesidade está associado com aumento na expressão de NLRP3 e citocinas próinflamatórias.

O consumo de HFD ou o modelo de obesidade induzida por dieta (DIO, *Diet induced obesity*) é um modelo bem descrito e muito empregado para estudar alterações metabólicas e imunológicas decorrentes da obesidade. O estudo de Finucane e colaboradores mostrou que animais tratados com HFD enriquecida com ácidos graxos monossaturados tiveram redução na expressão de NLRP3 e de caspase 1, e na secreção de IL-1 β (Finucane, Lyons et al. 2015). Assim, os estudos experimentais e clínicos reportam uma associação de NLRP3 com a obesidade e resistência à insulina. Porém, existem resultados contraditórios, que justificam a necessidade de maior investigação no tema em questão.

Além do NLRP3, o TLR4 também é um receptor que participa da metainflamação resultante da obesidade. Os ácidos graxos livres circulantes podem ativar a sinalização de TLR4 nos adipócitos ou nos macrófagos e induzir a expressão de genes inflamatórios (Shi, Kokoeva et al. 2006). Além disso, o LPS derivado das bactérias gram-negativas presentes no intestino, pode se acumular no tecido adiposo, funciona como ligante de TLR4 (Shi, Kokoeva et al. 2006, Cani, Amar et al. 2007, Reilly and Saltiel 2017). Além

da expressão de citocinas próinflamatórias, O LPS induz a produção de ROS, quimiocinas e eicosanóides, que contribuem para a resistência à insulina no tecido adiposo e em outros tecidos alvos desta molécula (Shi, Kokoeva et al. 2006, Kim and Sears 2010). Como resultado desta interação, pode ocorrer aumento na produção de IL-1 β , IL-6, TNF, MCP-1, além dos hormônios leptina e adiponectina nos indivíduos obesos (Inouye, Shi et al. 2007, Mathis and Shoelson 2011, Osborn and Olefsky 2012).

Evidências experimentais também mostraram alterações no número e na função das células T nos indivíduos obesos. Já foi descrito aumento no número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no tecido adiposo epididimal (Strissel, DeFuria et al. 2010) e diminuição de células Treg (Nishimura, Manabe et al. 2009). Outro estudo descreveu aumento de células Treg no baço de camundongos obesos, mas não no tecido adiposo (Deiuliis, Shah et al. 2011). Feuerer e colaboradores mostraram maior número de células Treg Foxp3⁺ no tecido adiposo abdominal de camundongos normais comparados aos animais obesos resistentes à insulina (Feuerer, Herrero et al. 2009). Estudos clínicos mostraram que mulheres com sobrepeso apresentaram aumento de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Womack, Tien et al. 2007), enquanto em crianças obesas foi descrito aumento de neutrófilos, monócitos, células T, B e NK no sangue periférico (Zaldivar, McMurray et al. 2006).

Todos esses achados mostram que a obesidade exerce papel importante na ativação da resposta inflamatória e na ativação da resposta imune adaptativa, podendo afetar outros órgãos como, coração, fígado e pulmão.

1.5. Obesidade e infecções do trato respiratório

Embora à obesidade esteja associada, principalmente, com doença cardiovascular e com diabetes, o excesso de tecido adiposo é considerado fator de risco para doenças respiratórias (Mancuso 2013). A obesidade interfere na função respiratória, diminuindo o volume pulmonar e a capacidade respiratória, e reduz a defesa do hospedeiro contra vírus, bactérias e fungos (Falagas and Kompoti 2006, Easterbrook, Dunfee et al. 2011, O'Brien, Vogel et al. 2012, Wan, Yuan et al. 2016). Portanto, a obesidade afeta a fisiologia do sistema respiratório e altera as funções da resposta imune. Na condição de comorbidade, ou seja, obesidade associada a outras doenças pulmonares, como asma,

pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo, o resultado pode ser o maior comprometimento da função pulmonar (Mancuso 2010, Mancuso 2013, Shore and Cho 2016).

Animais obesos e infectados com o vírus influenza A apresentaram alteração da capacidade citotóxica de células NK, retardo na produção de IL-6 e TNF, e diminuição da expressão de mRNA para IFN- α e IFN- β (Smith, Sheridan et al. 2007). Os mesmos autores mostraram menor eficiência no recrutamento de células T CD8⁺ para o pulmão e diminuição na produção de IL-2 e IL-12 nos animais obesos comparados aos animais não obesos (Smith, Sheridan et al. 2009). No modelo experimental de infecção com o vírus H1N1, animais obesos foram mais suscetíveis e apresentaram aumento da patologia pulmonar (Karlsson, Sheridan et al. 2010, Easterbrook, Dunfee et al. 2011).

A obesidade está associada com maior risco de desenvolvimento de pneumonia nos indivíduos hospitalizados comparados aos pacientes não obesos (Bochicchio, Joshi et al. 2006, Falagas and Kompoti 2006). Do contrário, também foi descrito que obesidade tem uma associação protetora contra pneumonia, reduzindo a mortalidade pela infecção (Mancuso 2013).

Estudos com camundongos deficientes para leptina (*ob/ob*) mostraram aumento da carga bacteriana e redução da sobrevivência após infecção com *Klebsiella pneumoniae* ou *Streptococcus pneumoniae* (Mancuso, Gottschalk et al. 2002, Hsu, Aronoff et al. 2007, Mancuso 2013). Assim, a obesidade influencia na ativação da resposta imune e pode aumentar o risco de desenvolvimento de infecções bacterianas no pulmão.

A desnutrição é um dos fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose. Estudos epidemiológicos sugerem que o sobrepeso poderia ser um fator protetor contra TB. Um estudo feito na população de Hong Kong mostrou que a obesidade e o sobrepeso estão associados a um menor risco de desenvolver TB pulmonar em uma população de idosos (Leung, Lam et al. 2007). Outro estudo mostrou essa mesma associação inversa entre sobrepeso e TB, indicando que a incidência da tuberculose aumentou quando o índice de massa corpórea (IMC) diminuiu (Lönnroth, Williams et al. 2010). Hanrahan e colaboradores, partindo de uma coorte de pacientes HIV⁺, mostraram que aqueles pacientes com sobrepeso ou obesos tinham menor chance de desenvolver TB em relação aos que apresentaram menor peso ou menor IMC (Hanrahan, Golub et al. 2010).

Recentemente, um último estudo avaliou uma população em Taiwan, incluindo pessoas saudáveis maiores de 18 anos, excluindo idosos e outras doenças. Uma vez mais foi constatado que a obesidade/sobrepeso reduz o risco de adquirir TB ativa (Yen, Hu et al. 2017).

O único estudo em animais relacionando TB e obesidade foi realizado empregando camundongos *ob/ob*. Os animais *ob/ob* infectados com *M. tuberculosis* foram mais suscetíveis à infecção e tiveram drástica redução na produção de IFN- γ comparados aos animais WT (*Wild Type*) infectados (Wieland, Florquin et al. 2005).

A prevalência da obesidade tem aumentado significativamente no mundo. A obesidade é um fator de comorbidade para diversas doenças, inclusive doenças respiratórias. No entanto, pouco se sabe como a obesidade afeta a tuberculose ativa ou o desenvolvimento da tuberculose porque aumento do IMC não necessariamente está associado com uma dieta saudável. Nesse contexto, considera-se importante avaliar o impacto da obesidade durante a infecção com *M. tuberculosis*.

1.6. Considerações gerais sobre microbiota e ativação da resposta imunológica

A microbiota coloniza diferentes superfícies e mucosas de nosso organismo, como a pele, o trato respiratório, a boca, o intestino e a vagina. Entretanto, a colonização é maior no trato intestinal (Bäckhed, Ley et al. 2005, Clemente, Ursell et al. 2012). Existe uma relação benéfica entre microbiota e hospedeiro, caracterizada por dois efeitos: a microbiota produz metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que modulam a resposta imune; e a microbiota protege o hospedeiro contra infecções por microrganismos patogênicos, por meio de mecanismos de competição ou inibição de crescimento (Gill, Pop et al. 2006).

O trato intestinal humano alberga o maior número e diversidade de microrganismos, sendo constituído por cerca de 10^{13} a 10^{14} microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários (Jia, Li et al. 2008, Chabé, Lokmer et al. 2017). Evidências indicam que a colonização bacteriana intestinal é fundamental no metabolismo energético e na função da resposta imune ao hospedeiro (Clemente, Ursell et al. 2012). A microbiota intestinal dos adultos é constituída por vários filos como, Bacteroidetes (gram-negativas) e Firmicutes (gram-positivas), os quais se encontram em

maior proporção, assim como Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, que são encontrados em menor proporção (Eckburg, Bik et al. 2005).

O filo Firmicutes inclui os gêneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Fecalibacterium* e *Roseburi*. O filo Bacteroidetes inclui os gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Xylanibacter*, importantes na degradação das fibras. Outros filós, como Actinobacteria, contêm a *Bifidobacterium* associada com a diminuição de triglicerídeos em animais obesos (Yin, Yu et al. 2010). O filo Proteobacteria inclui *Escherichia* e *Desulfovibrio*, e o Filo Verrucomicrobia inclui o gênero *Akkermansia*, importante bactéria envolvida na degradação do muco do trato intestinal (Schroeder and Bäckhed 2016).

A microbiota intestinal desempenha papel importante na saúde, e é associada com mudanças metabólicas e patologias como diabetes e doenças cardiovasculares (Jia, Li et al. 2008). A composição das bactérias comensais do intestino sofre alterações pela influência de fatores genéticos e ambientais, que se iniciam no início da vida. Assim, o tipo de parto influencia na colonização microbiana. No parto normal, os recém-nascidos têm contato com a microbiota vaginal da mãe. Entretanto, no parto por cesárea, os bebês que não tem esse contato com a microbiota da mãe podem desenvolver doenças, como as alergias (Clemente, Ursell et al. 2012, Borre, O'Keeffe et al. 2014). Uma dieta pobre em fibra pode ter um efeito significativo na alteração da composição da microbiota intestinal, diminuindo a produção de AGCC (Desai, Seekatz et al. 2016). O consumo de dieta ocidental (ingestão elevada de produtos processados e refinados) também afeta a microbiota, assim como o uso de antibióticos e o estilo de vida (Jernberg, Löfmark et al. 2010).

Evidências clínicas e experimentais mostraram que a disbiose intestinal está significativamente associada com a obesidade (Ley, Turnbaugh et al. 2006, Rabot, Membrez et al. 2016). No modelo de obesidade e diabetes empregando camundongos *ob/ob*, foi evidenciado o aumento do filo Firmicutes e diminuição do filo Bacteroidetes (Ley, Bäckhed et al. 2005). O mesmo padrão de disbiose foi observado na microbiota intestinal de pessoas obesas comparadas com pessoas magras (Ley, Turnbaugh et al. 2006, Lecomte, Kaakoush et al. 2015).

Para responder se a microbiota intestinal influencia como fator importante na indução da metainflamação decorrente da obesidade induzida pela dieta, animais totalmente livres de microbiota (*germ-free*) receberam transplante fecal de animal obeso (*ob/ob*). Esses animais ganharam peso em comparação aos camundongos que receberam transplante fecal de animal não obeso (Turnbaugh, Ley et al. 2006). Em outro estudo, animais *germ free* que receberam transplante de microbiota intestinal rica em Bacteroidetes, foram menos intolerantes à glicose quando comparados aos animais que receberam transplante de fezes de animal obeso alimentado com HFD (Rabot, Membrez et al. 2016). Um estudo recente também mostrou que animais alimentados com HFD apresentaram alteração na composição da microbiota intestinal, intolerância à glicose e diminuição dos AGCC (ácidos graxos de cadeia curta) quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão (LFD, *Low Fat Diet*) ou dieta normal (*CHOW*) (Dalby, Ross et al. 2017). Isso sugere que a disbiose intestinal nos animais obesos está envolvida diretamente com resistência à insulina, e pode levar ao aumento da inflamação no tecido adiposo.

Além disso, vários estudos mostraram que a microbiota desempenha papel importante na homeostase do sistema imunológico do hospedeiro, fazendo um balanço entre ativação e tolerância imunológica (Wu and Wu 2012, Belkaid and Hand 2014). A microbiota está associada com a diferenciação e ativação de células Th1, Th2, Th17 e Treg (Lee and Kim 2017).

Os AGCC são metabólitos produzidos pelas bactérias anaeróbicas comensais do intestino após fermentação da dieta rica em fibras, e são importantes para induzir a diferenciação de células Treg (Arpaia, Campbell et al. 2013, Furusawa, Obata et al. 2013). São formados por 4 a 6 carbonos. O acetato (C2) e o propionato (C3) são produzidos por bactérias do filo Bacteroidetes, e o butirato (C4) é sintetizado pelo filo Firmicutes (Lu, Fan et al. 2016). Eles se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPR), como GPR43, GPR41 e GPR109A; este último interage apenas com butirato. O GPR43 e GPR41 são expressos nas células epiteliais do cólon, nos adipócitos, no baço, em células do sangue periférico (linfócitos, DC, macrófagos e monócitos) (Ang and Ding 2016, Lu, Fan et al. 2016). No intestino, os AGCC estão relacionados com motilidade e absorção. Por serem pequenos, entram na corrente sanguínea e atuam sistemicamente,

influenciando a proliferação de células hematopoiéticas (Shore and Cho 2016). Além disso, apresentam função anti-inflamatória por induzirem a diferenciação de células Treg no intestino e no cólon, como descrito anteriormente. Também participam da inibição da atividade da histona deacetilase, influenciando a transcrição de genes relacionados com a ativação das células Treg (Corrêa-Oliveira, Fachi et al. 2016). A administração de butirato, propionato e acetato evitou o desenvolvimento de obesidade induzida por dieta e o desenvolvimento de resistência à insulina (Lin, Frassetto et al. 2012). O tratamento com AGCC na dieta também protegeu os animais de desenvolverem diabetes tipo 1 (Mariño, Richards et al. 2017). Animais que receberam HFD tiveram redução nas concentrações de acetato nas fezes e no plasma (Kimura, Ozawa et al. 2013). Entretanto, animais *ob/ob* apresentaram aumento das concentrações de butirato e acetato no intestino quando comparados a animais não obesos (Turnbaugh, Ley et al. 2006).

Trompette e colaboradores mostraram que camundongos alimentados com dieta complementada com AGCC exibiram aumento de Bacteroidetes e diminuição de Firmicutes nas fezes (Trompette *et al.*, 2014). Nesse mesmo estudo, os autores mostraram que propionato promoveu o desenvolvimento de monócitos inflamatórios, que migraram para os pulmões, onde se diferenciaram em células dendríticas com pouca capacidade de induzir células Th2, resultando na proteção para o desenvolvimento de asma alérgica (Trompette, Gollwitzer et al. 2014). No entanto, os AGCC podem também induzir a proliferação de células Th1 produtoras de IFN- γ e Treg *in vitro* (Kespohl, Vachharajani et al. 2017). Desse modo, os AGCC apresentam efeito pleiotrópico e participam da resposta imunológica no intestino e em outros órgãos periféricos.

Durante a disbiose gerada pela obesidade, ocorre expansão de células T, disfunção da barreira intestinal e aumento na permeabilidade, ocasionando a translocação bacteriana, a qual pode atingir fígado, pulmões, cérebro e sistema cardiovascular (Schroeder and Bäckhed 2016). Em adição, pode ocorrer desequilíbrio dos AGCC, causando impacto positivo ou negativo na resposta inflamatória (Samuelson, Welsh et al. 2015).

Considerando a TB como a doença infecciosa que causa o maior número de mortes no mundo, e sabendo que a obesidade gera metainflamação, disbiose, pode

aumentar a suscetibilidade a infecções nas vias aéreas e comprometer a função pulmonar, nossa hipótese de estudo era que a obesidade diminui a resistência à infecção por *M. tuberculosis*. Deste modo, buscamos investigar possíveis mecanismos que regulam a suscetibilidade e a inflamação pulmonar na comorbidade obesidade e tuberculose, com intuito de abrir novas perspectivas para o delineamento de terapias direcionadas para o hospedeiro e diferenciadas para o controle da TB.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o impacto da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica durante a infecção por *M. tuberculosis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros que caracterizam a obesidade antes e após infecção com *M. tuberculosis*;
- Analisar a progressão da infecção e a inflamação pulmonar em animais obesos infectados com *M. tuberculosis*;
- Mensurar os leucócitos da imunidade inata e adaptativa nos pulmões na condição de obesidade durante a infecção por *M. tuberculosis*;
- Determinar a atividade funcional de leucócitos da imunidade inata e adaptativa nos pulmões;
- Investigar se NLRP3 exerce papel na progressão da infecção com *M. tuberculosis* e na indução da resposta inflamatória pulmonar durante a obesidade;
- Avaliar a microbiota intestinal e pulmonar decorrente da obesidade nos animais infectados;
- Determinar a porcentagem de ácidos graxos de cadeia curta nos animais infectados, alimentados com HFD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 SPF (*Specific Pathogen Free*) selvagens (WT - *Wild Type*) e camundongos geneticamente deficientes para NLRP3 (*NLRP3*^{-/-}), 6 semanas de idade, foram fornecidos pelo Biotério de Animais Isogênicos e pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

. Os animais foram mantidos em microisoladores em laboratório nível II antes da infecção com *M. tuberculosis* e em laboratório nível III de biossegurança após infecção, com livre acesso à água e ração. Os procedimentos de manutenção de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Experimentação da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 141/2014) de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. Dieta dos animais

Os animais C57BL/6 WT ou *NLRP3*^{-/-} receberam as respectivas dietas durante 90 dias, seguindo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93G) para roedores (Reeves, Nielsen et al. 1993). Os animais foram alimentados com dieta purificada AIN-93G modificada para dieta hiperlipídica (*High Fat Diet*- HFD), contendo 35% de lipídeos, sendo 4% de origem vegetal (óleo de soja) e 31% de origem animal (gordura suína Sadia). A quantidade total de calorias da dieta HFD continha 15% kcal de proteínas, 64% kcal de carboidratos e 16% kcal de lipídeos. Os grupos controles receberam uma dieta normolipídica de acordo como o AIN-93G (*Low Fat Diet* - LFD), que continha 20% kcal de proteínas, 26% kcal de carboidratos e 59% kcal de lipídeos (**Tabela 1**). A dieta e a água foram oferecidas ad libitum. As dietas LFD e HFD foram preparadas manualmente e armazenadas a 5°C em recipientes de polipropileno.

Tabela 1. Descrição dos ingredientes que contem a dieta LFD (a) e HFD (b)

a)	Dieta LFD (<i>Low Fat Diet</i>)	
	Ingredientes	100 g
	Amido	39,8
	Caseína	20
	Maltodextrina	13,2
	Sacarose	10
	Óleo de soja	7
	Banha	0
	Celulose	5
	Mix minerais	3,5
	Mix vitaminas	1
	L-cistina	0,3
	Bitartarato de colina	0,25
b)	Dieta HFD (<i>High Fat Diet</i>)	
	Ingredientes	100 g
	Amido	11,8
	Caseína	20
	Maltodextrina	13,2
	Sacarose	10
	Óleo de soja	4
	Banha	31
	Celulose	5
	Mix minerais	3,5
	Mix vitaminas	1
	L-cistina	0,3
	Bitartarato de colina	0,25

3.3. Preparação do inóculo de *M. tuberculosis*

A preparação do inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) para infecção foi realizada a partir de uma alíquota de micobactérias (1000 µL) congelada a -70°C (com viabilidade superior a 85%), de acordo com metodologia descrita por Fonseca et al. (da Fonseca, Silva et al. 2009). Essa alíquota de micobactérias foi distribuída em 2,5 mL de meio Middlebrook 7H9 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA) enriquecido com

10% de OADCTM (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA), seguindo-se incubação por 10 dias a 37°C. Após incubação a suspensão foi diluída para determinar sua concentração utilizando como padrão a Escala de McFarland, que representa 1×10^7 bacilos/mL, como descrito previamente (da Fonseca et al., 2007). Para quantificação do inóculo experimental (controle da infecção) uma alíquota de 100 µL do mesmo inóculo foi diluído 1:100, 1:1000, 1:10.000 e 1:100.000. Em seguida, 100 µL de cada uma das diluições foram plaqueados em meio 7H11 (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, EUA), e as placas foram incubadas por 28 dias a 37°C. Após o período de incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC) e corrigidas pelo fator de diluição.

3.4. Infecção intra-traqueal

Cada animal foi infectado com 100 µL de suspensão contendo 1×10^5 bacilos por via intra-traqueal. Para esse procedimento, os animais foram previamente anestesiados, por via intraperitoneal, com 20% de cloridrato de ketamina (ketamina Agener 10% - União Química Farmacêutica, SP, Brasil) e 10% xylazina (Dopaser- Laboratório Calier S. A., Barcelona, Espanha) diluídos em solução salina. A infecção foi realizada através de procedimento cirúrgico após a exposição da traqueia. Todos os procedimentos de cultura da micobactéria, preparo do inóculo e infecção dos animais foram realizados em laboratório de nível de biossegurança III. Os animais foram infectados 60 dias após a ingestão da dieta HFD ou LFD. Os ensaios imunológicos, ensaio de quantificação de bacilos e histopatológica foram realizados 30 dias após a infecção, totalizando 90 dias de dieta HFD ou LFD.

3.5 Grupos experimentais de estudo

- Os primeiros grupos experimentais foram os seguintes:

Grupo 1= C57BL/6 alimentados com LFD (LFD)

Grupo 2= C57BL/6 alimentados com HFD (HFD)

Grupo 3= C57BL/6 alimentados com LFD + infecção com *M. tuberculosis* (LFD/Mtb)

Grupo 4= C57BL/6 alimentados com HFD + infecção com *M. tuberculosis* (HFD/Mtb)

- Os segundos grupos experimentais foram os seguintes:

Grupo 1= C57BL/6 alimentados com LFD + infecção com *M. tuberculosis* (LFD/Mtb)

Grupo 2= C57BL/6 alimentados com HFD + infecção com *M. tuberculosis* (HFD/Mtb)

Grupo 3= *NLRP3*^{-/-} alimentados com LFD + infecção com *M. tuberculosis* (*NLRP3*^{-/-} HFD/Mtb)

Grupo 4= *NLRP3*^{-/-} alimentados com HFD + infecção com *M. tuberculosis* (*NLRP3*^{-/-} LFD/Mtb)

3.6 Parâmetros da obesidade

3.6.1 Pesagem semanal dos animais

Sendo a obesidade definida como a quantidade excessiva de gordura corporal em relação à massa magra, a massa corpórea dos animais foi avaliada a cada semana até o término do experimento (90 dias).

3.6.2 Pesagem dos tecidos adiposos

Trinta após infecção com *M. tuberculosis*, os animais foram submetidos a eutanásia e os tecidos adiposos visceral retroperitoneal e mesentérico foram coletados e pesados.

3.6.3 Dosagem de glicemia

Antes da infecção com *M. tuberculosis*, os animais foram submetidos à dosagem de glicose no sangue. Após seis horas de jejum e com livre acesso à água, a glicose foi mensurada por meio de sangue obtido da veia da cauda, utilizando-se o glicosímetro *Accu-check Performa Nano* (Roche, EUA) e quando as tiras *Accu-check® Performa* (Roche, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

3.6.4 Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (ipGTT, *intraperitoneal glucose tolerance test*)

Após os trinta dias da infecção com *M. tuberculosis*, os animais foram submetidos a jejum de 6 horas com livre acesso à água. Uma primeira coleta de sangue foi realizada no tempo 0, e em seguida, a glicose (D-(+)-Glucose, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA) (2g/Kg de peso corporal) foi injetada no peritônio dos animais. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos: 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. A glicemia foi

mensurada quando o glicosímetro *Accu-check Performa Nano* (Roche, EUA) como já descrito anteriormente e a intolerância à glicose foi avaliada utilizando a área sob a curva (ASC) para a glicose.

3.6.5 Dosagem de insulina

Após os trinta dias da infecção com *M. tuberculosis*, foi coletado sangue dos animais previamente anestesiados. A detecção de insulina foi feita a partir do soro seguindo o protocolo do *kit Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA* (Alpco Diagnostics, EUA) para 25 µL de amostra. O ensaio foi realizado de acordo as instruções do fabricante.

3.7. Obtenção e digestão do pulmão

A eutanásia foi realizada aos 30 dias de infecção (ou aos 90 dias de dieta). Os pulmões foram coletados e colocados em placas de *Petri* de 22 mm de diâmetro (Corning, NY, EUA) estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e processados de acordo com metodologia descrita previamente (da Fonseca, Silva et al. 2009). Brevemente, os lóbulos medianos e inferiores do pulmão direito de cada animal, destinados aos ensaios de UFC e citometria de fluxo foram pesados, cortados em fragmentos e ressuspensos em meio RPMI-1640 contendo 0,5 µg/mL de Liberase (Liberase Blendzyme-Roche, Indianapolis, IN, EUA) e 25 U/mL de deoxiribonuclease (DNase) I de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, MO, EUA). As suspensões de pulmões foram incubadas a 37°C por 30 minutos, e após a digestão, foi realizado um procedimento mecânico para garantir a digestão com ajuda de uma seringa de 10 mL. Em seguida, a suspensão celular de pulmão foi centrifugada por 10 minutos a 453 x g, a 4°C, e o sedimento celular foi ressuspensão em 1 mL de RPMI-1640 contendo 10% de Soro bovino fetal (SBF- Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA).

3.8. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Uma alíquota de 100 µL foi retirada após a digestão dos fragmentos de pulmão e diluída em PBS estéril. Um volume igual a 100 µL das diluições 100, 1000, 10.000 e 100.000 vezes foi plaqueado em meio sólido 7H11: 7H9 (*Difco Laboratories*, Detroit, MI, EUA) acrescido de ágar bacteriológico (*Difco Laboratories*, Detroit, MI, EUA). As

placas foram vedadas e incubadas a 37°C por 21 dias. Decorrido o período de incubação, as colônias de micobactérias foram contadas com auxílio de lupa (Leica Microsystems, ZOOM 2000). O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e o peso dos pulmões expressos em Log₁₀ do número de UFC por pulmão.

3.9. Obtenção de células do pulmão e dos linfonodos

3.9.1 Pulmão

Após a realização do ensaio de UFC, 4 mL de meio RPMI contendo 10% de SBF foram acrescentados às suspensões pulmonares. As células obtidas foram separadas dos fragmentos de pulmão utilizando um filtro de 100 µm (*Cell Strainer*, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), o qual, posteriormente, foi lavado com 5 mL de meio RPMI incompleto. O filtrado obtido foi centrifugado a 453 x g, por 10 minutos a 4°C. O sedimento celular resultante foi submetido ao protocolo de lise de hemácias, adicionando 2 mL de tampão ACK (0,15M de NH₄CL, 10 mM de KHCO₃, 0,1Mm de EDTA diluídos em H₂O) por 2 minutos, seguindo-se lavagem com 10 mL de PBS e centrifugação a 453 x g, por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o sedimento celular foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI incompleto. A contagem total de células foi realizada utilizando contador automático *Countess™* (*Automated Cell Counter* – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em uma diluição de 1:10. A suspensão celular obtida a partir da digestão dos pulmões foi destinada para cultura de células e análise de citometria de fluxo.

3.9.2. Linfonodos

Os linfonodos do mediastino foram coletados em uma placa de Petri de 35 mm com 2 mL de RPMI-1640 incompleto (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Com uma pinça foram transferidos a um filtro de 100 µm (*Cell Strainer*, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e homogeneizados com um auxílio do êmbolo da seringa. Após homogeneização, procedeu-se lavagem com 3 mL de meio RPMI incompleto. A suspensão celular resultante foi centrifugada a 453 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi submetido à lise por 1 minuto com tampão ACK, seguindo-se lavagem com 10 mL de PBS e centrifugação a 453 x g por 10 minutos, a 4°C. No

final, as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI incompleto e a contagem realizada no *Countess™* (*Automated Cell Counter* – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

3.10. Cultura de células do pulmão e linfonodos

Em placa de 96 poços (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), 5×10^5 células, obtidas a partir da digestão dos pulmões e as células do linfonodo, foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de SBF, 10.000 U/mL de penicilina (Gibco, New York, EUA), 10.000 g/mL de estreptomicina (Gibco, New York, EUA) e 10 mg/mL de gentamicina (Gibco, New York, EUA), e foram estimuladas com 100 ng/mL de PMA (*Phorbol 12- Myristate 13 Acetate* - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e 500 ng/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). Como controle negativo, as células foram cultivadas apenas em presença de meio de cultura. Monensina, um inibidor do transporte de proteína (0,6 µL/mL de GolgiStop™ - BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) foi adicionada concomitantemente aos estímulos. As culturas de células de pulmões foram incubadas por 4 horas, a 37°C em 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, foi seguido o processo de detecção intracelular de citocinas.

3.11. Citometria de fluxo (FACS)

Os anticorpos foram adquiridos da BD Bioscience Pharmingen (Franklin Lakes, New Jersey, EUA), e-Bioscience (San Diego, CA, EUA) e Biolegend (San Diego, CA, EUA) e utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

3.11.1. Marcação extracelular

Para a realização da fenotipagem das populações de linfócitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e monócitos no pulmão, 1×10^6 células foram incubadas à 4°C por 40 minutos com sobrenadante de cultura de células 2.4G2 (contendo anticorpos anti-FcγRII/III), diluído 1:1. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais (**Tabela 2**), durante 30 minutos, à 4°C, no escuro. Após a incubação, as células foram ressuspensas com 2 mL de tampão PBS contendo 2% SBF, centrifugadas a 453 x g, por 10 minutos à 4°C, seguindo-se fixação com solução tamponada contendo 1% de formol (Synth, Brazil). As amostras foram adquiridas no citômetro FACSCanto™II

(BD, San José, CA, EUA), no qual foram coletados, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. As células foram avaliadas por tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e intensidade de fluorescência. Inicialmente, foi selecionada uma região para exclusão das células aderidas entre si, processo conhecido como exclusão de *doublets*. Para isso, as células foram selecionadas pelos parâmetros de FSC-A (área) e FSC-H (altura). Uma vez excluídos os *doublets*, foram utilizados os parâmetros de FSC-A e SSC-A, para selecionar a região correspondente aos linfócitos e às células mielóides. Entre os linfócitos, foram analisadas as células CD4⁺ e CD8⁺, e entre as células mielóides foram analisados os macrófagos *M1-like* (CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺CD16/32⁺), macrófagos M2 (CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺), células dendríticas (CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁺ ou CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻), neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺) e monócitos (CD11b⁺Ly6C⁺). Os dados foram analisados utilizando-se o software FlowJo™ 7.6.1 (Tree Star, Inc. Ashland, Oregon, EUA).

O número absoluto dos diferentes tipos celulares analisados foi obtido correlacionando a porcentagem dos mesmos nos diferentes órgãos analisados em relação ao número de células totais contadas em contador automático Countess™.

$$\frac{100\% \text{ ————— } \text{N}^{\circ} \text{ de células totais}}{X}$$

$$\% \text{ de células obtidas na citometria ————— } \text{n}^{\circ} \text{ de células de interesse}$$

3.11.2. Marcação intracelular fator de transcrição Foxp3

Foi utilizado o kit de marcação para fator de transcrição Foxp3 (Staining Buffer Set, eBioscience, San Diego, CA, EUA). Após a marcação das moléculas de superfície, 250 µL do tampão Foxp3 *fixation/permeabilization* foram adicionados por tubo, seguindo-se agitação vigorosa, e incubação por 18 horas, à 4°C no escuro. Após o período de incubação, 500 µL de *Permeabilization buffer* 1x foram adicionados a cada tubo, e centrifugados a 453 x g, por 5 minutos à 4°C. O procedimento foi feito duas vezes, e após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 µL de *Permeabilization buffer* 1x e incubadas com anticorpo Foxp3 (Tabela 2) durante 30 minutos, a temperatura ambiente no escuro. Em seguida as células foram ressuspensas com 1 mL de

Permeabilization buffer 1x, centrifugadas a 453 x g, por 5 minutos à 4°C e ressuspensas em 100 µL de PBS. As amostras foram adquiridas como descritas anteriormente.

3.11.3. Detecção intracelular de citocinas

Após a realização de cultura de células de pulmão as células foram coletadas e fixadas com 4% de formaldeído (Synth – Diadema, SP, Brasil) diluído em PBS, para volume final de 120 µL. As células foram agitadas vigorosamente e incubadas por 11 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS e a suspensão celular foi incubada por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 453 x g, por 10 minutos a 4°C e lavada com 1 mL de PBS. Para a permeabilização, a suspensão celular foi ressuspensa em tampão de permeabilização contendo 1% de SBF e 0,2% de saponina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) diluídos em PBS para volume final de 1 mL por tubo. A suspensão celular foi agitada vigorosamente e centrifugada a 453 x g, por 10 minutos, à 4°C. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 50 µL de tampão de permeabilização contendo sobrenadante de cultura de células 2.4G2, diluído 1:1 e incubadas por 20 minutos, a 4°C. Após o bloqueio, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais IFN-γ e IL-17 (**tabela 2**), durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de tampão de permeabilização e lavadas novamente com 1 mL de PBS. Por fim, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS. As amostras foram adquiridas em FACSCantoTMII e analisadas utilizando-se o software FlowJoTM 7.6.1, como descrito no anteriormente.

Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo

Populações celulares	Anticorpo	Clone	Fabricante
Linfócitos	CD4-APC	RM4-5	BD Bioscience, EUA
	CD8-FITC	53-67	BD Pharmigen, EUA
	CD4-APC Cy7	RM4-5	Biolegend, EUA
	Foxp3 -PE	MF 23	BD Bioscience, EUA
Células dendríticas	CD11c-Pe-Cy7	HL3	BD Bioscience, EUA
	CD11b-APC-Cy7	M1/70	Biolegend, EUA
	I-Ab-FITC	9/25/17	BD Bioscience, EUA
	CD103 PE	M290	BD Bioscience, EUA
Monócitos/Neutrófilos	CD11c-Pe-Cy7	HL3	BD Bioscience, EUA
	CD11b-APC-Cy7	M1/70	Biolegend, EUA
	Ly6G-APC	1A8	BD Bioscience, EUA
	Ly6C-Percp-Cy5.5	AL-21	BD Bioscience, EUA
Macrófagos	CD11c-Pe-Cy7	HL3	BD Bioscience, EUA
	CD11b-APC-Cy7	M1/70	Biolegend, EUA
	F4/80-Percp-Cy5.5	BM8	eBioscience, EUA
	CD16/32 APC	93	Biolegend, EUA
Citocinas	IL-1 β PE	NJTEN3	Thermo Fisher Scientific, EUA
	IL-6 PE	MP5-20F3	Biolegend, EUA
	IFN- γ -PE-Cy7	XMG1.2	Biolegend, EUA
	IL-17 APC	TC11-18M 10.1	Biolegend, EUA

3.12. Análise histopatológica

O lóbulo superior direito do pulmão e os tecidos adiposos foram acondicionados em solução de formol tamponado. Os cortes de 7 μ m corados com hematoxilina/eosina (H&E) para a visualização do infiltrado celular no pulmão e para observação do tamanho dos adipócitos foram realizadas pela Sr^a. Deisy Mara da Silva, técnica do Laboratório de Patologia Celular e Molecular de Doenças do Fígado, Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP. Os cortes de 7 μ m a partir dos pulmões foram corados

com Ziehl-Neelsen (ZN), para visualização das bactérias ácido-álcool resistentes, pela Sr^a. Elaine Medeiros Floriano, técnica do Laboratório de Patologia Pulmonar, Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP. As análises histopatológicas de pulmão e tecido adiposo, e da coloração ZN foram realizadas pela Prof^a. Dr^a. Leandra N. Z. Ramalho, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP.

O *score* histopatológico utilizado foi: grau 0: ausência ou presença de raras células inflamatórias (sem inflamação); grau 1: coleção perivascular ou peri-brônquica de células inflamatórias, predominantemente linfócitos, às vezes formando agregados linfóides esparsos (inflamação leve); grau 2: coleção perivascular ou peri-brônquica de células inflamatórias, predominantemente linfócitos e macrófagos xantomosos, formando frequentes agregados linfóides, às vezes coalescentes, preservando parte dos espaços alveolares (inflamação moderada); grau 3: coleção perivascular ou peri-brônquica de células inflamatórias, predominantemente linfócitos e macrófagos xantomosos, formando frequentes agregados linfóides, na maior parte coalescentes, preservando raros espaços alveolares (inflamação grave).

3.13. Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR) em tecido adiposo.

3.13.1. Extração de RNA

Amostras de tecido adiposo visceral mesentérico foram coletados em 0,5 mL de solução de Trizol (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e foram homogeneizados com o auxílio de homogeneizador S10NG IKA® T10 basic (IKA®-Werke GMHB & Co. KG, Staufen-Alemanha). Em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio por 15 minutos a temperatura ambiente, seguindo-se agitação vigorosa cada 5 minutos. Após incubação, foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos, e o sobrenadante foi separado e ressuspenso em álcool 70%. A partir dessa etapa o RNA foi extraído conforme as instruções do fabricante do kit RNAspin mini (GE Health Care, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) tratado com DNase I 10x (*Invitrogen by life Biotechnologies*TM, Carlsbad, CA, EUA). O RNA obtido foi quantificado utilizando o aparelho Nanodrop e o programa ND1000V37.1 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

3.13.2. Preparação de DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi preparado a partir de 1 µg do RNA extraído das amostras do tecido adiposo. A síntese de cDNA foi realizado empregando os reagentes da *Invitrogen by life Biotechnologies*TM, Carlsbad, CA, EUA. As amostras foram incubadas com 1 µL de EDTA 25mM, à 65°C durante 15 minutos, seguindo-se incubação de 2 minutos à 42°C com 1 µL de dNTPs 10 mM e 1 µL de OligodT 0.5 µg/µL, 2.5 µL de tampão 5x, 2.0 µL de DTT 0.1M, 0.5 µL de MgCl₂ 25mM e 2 µL de água ultrapura. Por último, foi adicionado 1 µL de *Super Script*TM II Reverse transcriptase, seguindo-se incubação por 15 minutos, à 70 °C, e incubação à 4 °C por 10 minutos. O cDNA foi quantificados utilizando *Nanodrop* e o programa ND1000V37.1 (Thermo Fisher Scientific, Wilmingyon, DE, EUA). As amostras de cDNA foram diluídas em água livre de RNase até atingir concentração de 100 ng/µL.

3.13.3. Quantificação da expressão de genes

Foi utilizado 3 µL do cDNA na concentração de 100 ng/µL para quantificar genes por RT-PCR. Foi acrescentado a essa diluição, 6.5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, EUA), 0.5 µL de cada para de primer (10 µM- *Invitrogen by life Biotechnologies*TM), Carlsbad, CA, EUA) e 2.5 µL de água livre de nucleases. As condições para amplificação dos genes de interesse compreendem uma fase inicial de incubação do cDNA a 50°C durante 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação a 95°C durante 10 minutos. Após esse período, as amostras passaram por 40 ciclos contendo fase de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, seguida de fase de anelamento a 58°C por 30 segundos e, finalmente, uma fase de extensão da fita de DNA a 72°C por 30 segundos. As reações e análises foram realizadas no aparelho *StepOnePlus*TM Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os resultados foram analisados com base no valor de CT (do inglês, *Cicle Threshold*). O CT é o ponto que indica o número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. A fórmula utilizada para análise dos resultados foi $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, na qual $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$ e $\Delta Ct = CT \text{ gene alvo} - CT \beta\text{-Actina}$ (gene de referência endógeno).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para quantificação de genes em tecido adiposo

Nome do gene	Tipo de <i>Primer</i>	Sequência 5' -->3'
β-2m	<i>Sense</i>	CACCCCCACTGAGACTGATACTACATA
	<i>Antisense</i>	TCACATGTCTCGATCCCAGTAGA
IL-1β	<i>Sense</i>	GTTTAATTCGATGATACGCGAG
	<i>Antisense</i>	TTAASCCGACACCTCACGG
IL-6	<i>Sense</i>	ATGTGGTTTAATTCTGAAGCA
	<i>Antisense</i>	AGCTGACGACAACCATGCAC
NLRP3	<i>Sense</i>	GTGGATGGTTTGCTGGGAT
	<i>Antisense</i>	CCCACTCTCACCTAGACGC

3.14. Avaliação da expressão gênica pela técnica de *PCR Array* em pulmão

A expressão gênica foi analisada a partir de amostras de pulmão utilizando o *kit* da *Qiagen Innate & Adaptive Immune Responses PCR Array* para 86 genes. A extração de RNA, síntese do DNA e reação de *PCR Array* foram realizadas segundo as especificações do fabricante.

3.14.1. Extração de RNA

Seguindo o protocolo de extração de *RNeasy® Mini Kit (Qiagen)*, as amostras com peso de 30 mg aproximadamente foram colocadas dentro de uma solução (1:100) de β-mercaptoethanol junto com tampão RLT em um volume final de 600 µL para cada amostra. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e logo centrifugadas a máxima velocidade por 3 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL e, em seguida foram adicionados 600 µL de álcool 70%, e a suspensão foi homogeneizada e transferida nas colunas de *RNeasy Spin* do *Kit*. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8000 x g a temperatura ambiente, e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, foram adicionados 350 µL de tampão RW1, procedendo-se centrifugação por 15 segundos a 8000 x g. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 80 µL da solução de DNase I (10 µL de DNase I stock para 70 µL de tampão RDD) para cada amostra, que foram incubadas por 15 min a

temperatura ambiente. Após incubação foram adicionados 350 µL de tampão RW1 nas colunas, seguindo-se centrifugação por 15 segundos a 8000 x g. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 500 µL de tampão RPE, seguindo-se centrifugação por 15 segundos. O mesmo procedimento foi repetido com outros 500 µL do mesmo tampão e após centrifugação por 1 minuto a 8000 x, as amostras foram transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL. Para finalizar, 50 µL de água livre de RNases foram acrescentados. As colunas foram centrifugadas a 8000 x g e os sobrenadantes contendo RNA foram quantificados utilizando *Nanodrop* e o programa ND1000V37.1 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

3.14.2. Síntese de cDNA

Para preparar o DNA complementar, a síntese foi feita segundo o protocolo do cDNA *Synthesis using the RT² First Strand kit* (Qiagen). Para eliminar o DNA genômico, 0,5 µg do RNA foi incubado com 2 µL de tampão GE por 5 minutos a 42°C, e por 1 minuto a 4°C. Após incubação, foram adicionados 10 µL do *mix*: transcriptase reversa (4 µL de 5x tampão BC3, 1 µL de *control* P2, 2 µL de RE3 transcriptase reversa e 3 µL de água livre de RNase) para cada amostra. As amostras foram incubadas a 42°C por 15 minutos, e imediatamente, foram incubadas a 95°C por 5 minutos para parar a reação. Após incubação, foram adicionados 91 µL de água livre de RNase. A concentração de cDNA foi quantificada utilizando *Nanodrop*.

3.14.3. Análise da expressão gênica

Seguindo o protocolo do *RT² ProfilerTM PCR Array Mouse Inate & Adaptive Immune Responses*: Foi preparada a solução *master mix* (1350 µL 2x RT² *Syber Green Master Mix*, 102 µL de cDNA, 1248 µL de água livre de RNase) e foram adicionados 25 µL da solução a cada poço de uma placa de 96 poços do *kit*. Após uma centrifugação a 1000 x g, por 1 minuto, a placa foi colocada no aparelho *StepOnePlusTM Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os resultados foram analisados pelo software *RT² Profiler PCR Array Data Analysis* versão 3.5.

3.15. Análise da microbiota

A microbiota intestinal e pulmonar foram detectadas por PCR em tempo real. Para isso, foram coletadas amostras das fezes e o lóbulo superior direito do pulmão. O DNA foi extraído utilizando o *Kit QIAamp DNA Stool Mini* (Qiagen) para as amostras das fezes e *DNeasy Blood & Tissue kits* (Qiagen) para amostras do pulmão, segundo as especificações do fabricante.

3.15.1. Reação em PCR em Tempo Real

Para cada reação de PCR foram utilizados 10 ng de cDNA a partir das amostras, 0,5 µL do *primer* forward (10 nm), 0,5 µL do *primer* reverse (10 nm) (Tabela 4) e 5 µL do *GoTaq qPCR Master Mix* (PROMEGA) com um volume final de 10 µL para cada reação. A reação foi realizada no aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para ativar a enzima *Taq DNA Polymerase Platinum*, a temperatura inicial foi de 95°C por 10 minutos, em seguida, a reação foi submetida a 40 ciclos de amplificação: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 60°C para a análise de todos os filos (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria) e 16S (Tabela 4) por 30 segundos, e extensão de fita complementar a 72°C por 30 segundos. A curva de dissociação (*melting*) foi realizada a 95°C por 15 segundos, a 60°C por 1 minuto e a 95°C por 15 segundos. Os resultados foram analisados pelo *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Software*, como descrito anteriormente. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (do inglês, *Cycle Threshold*). O CT é o ponto que indica o número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. A fórmula utilizada para análise dos resultados foi $2^{-\Delta Ct}$, na qual $\Delta Ct = Ct \text{ amostra} - Ct \text{ do normalizador (gene16S)}$. A expressão relativa de cada grupo foi obtido após normalização com cada grupo controle (Park, Goergen et al. 2016)

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados para quantificação de genes na microbiota intestinal e pulmonar

Nome do gene	Tipo de <i>Primer</i>	Sequência 5' -->3'
Actinobacteria	<i>Sense</i>	TGTAGCGGTGGAATGCGC
	<i>Antisense</i>	AATTAAGCCACATGCTCCGCT
Bacteroidetes	<i>Sense</i>	GTTTAATTCGATGATACGCGAG
	<i>Antisense</i>	TTAASCCGACACCTCACGG
Firmicutes	<i>Sense</i>	ATGTGGTTTAATTCGAAGCA
	<i>Antisense</i>	AGCTGACGACAACCATGCAC
Proteobacteria	<i>Sense</i>	CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG
	<i>Antisense</i>	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
16S	<i>Sense</i>	AACAGGATTAGATACCCTGGTAG
	<i>Antisense</i>	GGTTCTTCGCGTTGCATC

3.16. Permeabilidade intestinal

No dia do experimento, os animais foram submetidos a eutanásia e foi separada e coletada a parte distal do íleo. Com auxílio de uma seringa de 5 mL contendo PBS estéril foi lavada a porção de íleo para eliminar o excesso de fezes. Em seguida o íleo foi cortado em duas porções, sendo uma parte separada para extração de RNA e a outra para imunofluorescência. A extração de RNA, a síntese de cDNA e quantificação da expressão gênica foi analisada segundo o procedimento descrito anteriormente com as amostras de tecido adiposo. Os genes utilizados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Sequência dos *primers* utilizados para quantificação de genes em intestino (íleo)

Nome do gene	Tipo de <i>Primer</i>	Sequência 5' -->3'
Claudina-2	<i>Sense</i>	GGCTGTTAGGCACATCCAT
	<i>Antisense</i>	TGGCACCAACATAGGAACTC
ZO-1	<i>Sense</i>	TTCAAAGTCTGCAGAGACAATAGC
	<i>Antisense</i>	TCACATTGCTTAGTCCAGTTCC
Ocludina	<i>Sense</i>	ATGTCCGGCCGATGCTCTC
	<i>Antisense</i>	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT

3.17. Dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram detectados pela cromatografia gasosa empregando um detector de ionização em chama (FID, Flame ionization detector) de injeção líquida automática, equipada com uma coluna capilar de sílica segundo a metodologia descritos por Zhao e colaboradores e, com algumas modificações segundo Lu e colaboradores (Zhao, Nyman et al. 2006, Lu, Fan et al. 2016). Amostras de fezes foram coletadas a partir do trato intestinal dos animais e, armazenadas à -80 °C. No dia do processamento, 150 mg de fezes foram ressuspensas em 1,2 mL de água Milli-Q e homogeneizadas por aproximadamente 2 minutos. Posteriormente, foi ajustado o pH da suspensão para valores entre 2 e 3, adicionando HCl 5M. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 12 000 g x e o sobrenadante foi filtrado com auxílio de um filtro de 0,22 µm (*Cell Strainer*, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Após esse procedimento, o filtrado foi transferido para um *vial* transparente de 2mL com *insert* e tampa, pronto para ser inserido no Cromatógrafo de gases GC-2014 (SHIMADZU, USA). Um µL da solução foi injetado para análise dos AGCC. A análise cromatográfica foi feita usando uma coluna de Agilent 6890N GC e hélio como gás inerte para transportar amostra através da coluna, seguindo as condições experimentais por Zhao e colaboradores (Zhao, Nyman et al. 2006). A quantificação dos AGCC das amostras foi determinada com uma curva padrão de AGCC contendo ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido valérico, ácido isobutírico e ácido metilbutírico, previamente analisadas. As dosagens de AGCC foram realizadas no laboratório de Nutrição e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

3.18. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de citocinas no soro.

Para a detecção de citocinas no soro dos animais foi utilizado o kit imunoenzimático BD *OptEIA*TM Set (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O limite de detecção para IFN-γ foi de 31,25 pg/mL- 2000 pg/mL.

3.19. Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, EUA). Para análise de normalidade, os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov. Para a análise de dois grupos que tiveram distribuição normal, foi aplicado o teste t não pareado (*Unpaired*). Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico Mann Whitney. Para a análise de mais de dois grupos experimentais que apresentaram distribuição normal foram usados testes paramétricos: ANOVA (para análise de variância), seguido de teste Tukey. Para os dados que não apresentaram distribuição normal foram realizados testes não paramétricos: Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para *score* histológico, foi usado o teste qui-quadrado (X^2) entre os grupos experimentais, de acordo com recomendação da médica patologista Prof^a. Dr^a. Leandra N. Z. Ramalho, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP.

Para as correlações foi aplicado o teste de correlação de Pearson (R). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os números de R e P foram indicados apenas quando houve diferença estatística entre os grupos analisados.

4. RESULTADOS

4.1. Indução de obesidade pela dieta hiperlipídica

Para validar o modelo de obesidade, camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta padrão (LFD, *Low Fat Diet*) ou com dieta hiperlipídica (HFD, *High Fat Diet*) durante 60 dias (**Figura 1a**). Os animais alimentados com dieta HFD, durante esse período, apresentaram aumento evidente e significativo da massa corpórea (**Figura 1b, c**) e foram mais intolerantes à glicose quando comparados àqueles alimentados com dieta LFD (**Figura 1d**). Esses parâmetros de obesidade, como ganho da massa corporal e intolerância à glicose confirmam a indução da obesidade pela dieta hiperlipídica.

Figura 1. Indução de obesidade pela dieta hiperlipídica antes da infecção com *Mycobacterium tuberculosis*. Delineamento experimental para indução de obesidade em camundongos fêmeas C57BL/6 (a). Representação fotográfica confirmando a indução de obesidade (b). Massa corpórea durante 60 dias (8 semanas) de alimentação (c), glicemia de jejum de 6 horas (d). Os dados são representativos de um experimento reproduzido quatro vezes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 14-16). * = P < 0.05. A barra horizontal mostra a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = *Low Fat Diet*; HFD = *High Fat Diet*.

4.2. Manutenção dos parâmetros da obesidade após a infecção com *M. tuberculosis*

Decorridos 60 dias de alimentação com LFD ou HFD, os animais foram infectados com *M. tuberculosis*, e após 30 dias de infecção (totalizando 90 dias de dieta), os parâmetros de obesidade foram avaliados novamente (**Figura 2a**). Um dia antes da eutanásia, foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT) e o sangue foi coletado para dosagem de insulina. No dia da eutanásia, a massa corporal e os pesos dos tecidos adiposos visceral, retroperitoneal e mesentéricos foram determinados.

Os animais que receberam dieta HFD, infectados ou não com *M. tuberculosis*, apresentaram maior ganho de massa corpórea (obesos) (**Figura 2b, c**) com diminuição dos níveis de insulina no soro (**Figura 2d**) comparados aos animais alimentados como dieta LFD infectados ou não. Além disso, o grupo HFD infectado (HFD/Mtb) foi intolerante à glicose no teste GTT (**Figura 2e**) como mostra o gráfico da área sob a curva aos 120 minutos, com um aumento significativo de glicose comparado como os animais LFD infectados (LFD/Mtb) (**Figura 2f**).

Esses resultados mostram que após a infecção com *M. tuberculosis*, os animais mantiveram o ganho de peso, foram intolerantes à glicose e tiveram uma diminuição na produção de insulina que seria um indicio que os animais poderiam estar na condição prediabetes.

Figura 2. Manutenção dos parâmetros da obesidade após infecção com *M. tuberculosis*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta LFD ou HFD durante 60 dias, infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb) e avaliados 30 dias pós-infecção, totalizando 90 dias de dieta (a). Representação fotográfica dos animais alimentados com dieta LFD ou HFD após infecção (b), massa corpórea antes e após infecção (c), insulina sérica (d), teste de tolerância à glicose em sangue ao longo do tempo (e), e área sob a curva (ASC) da glicemia calculada aos 120 minutos (f). Os dados da massa corpórea são representativos de um experimento reproduzido quatro vezes; os dados da detecção de insulina são representativos de dois experimentos independentes; os dados da detecção de glicose são representativos de um experimento reproduzido três vezes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-6$). * = $P < 0.05$. Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos LFD e HFD. # representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos LFD/Mtb e HFD/Mtb. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.3. Avaliação dos tecidos adiposos após infecção com *M. tuberculosis*

Na obesidade, o tecido adiposo branco é um local de acúmulo de leucócitos, especialmente macrófagos M1 produtores de IL-1 β , IL-6 e TNF, que contribuem para a indução de metainflamação (Osborn and Olefsky 2012, Bing 2015, Kwok, Lam et al. 2016, Caër, Rouault et al. 2017).

No dia 90, dia da avaliação experimental, foram coletados os tecidos adiposos visceral retroperitoneal e mesentérico com a finalidade de mensurar os pesos e quantificar a expressão de genes inflamatórios. Como previsto, os grupos de animais HFD (obesos) e HFD/Mtb (obesos e infectados) apresentaram aumento dos pesos do tecido adiposo visceral retroperitoneal e mesentérico (**Figura 3a, b, c**), com aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) (**Figura 3d**) quando comparados aos respectivos grupos LFD (não obesos) ou LFD/Mtb (não obesos infectados). A hipertrofia dos adipócitos é consequência do acúmulo de lipídios, característica comum do tecido adiposo branco na obesidade (Kusminski, Bickel et al. 2016). Os pesos dos tecidos adiposos e hipertrofia dos adipócitos confirmam uma vez mais os parâmetros da obesidade após infecção.

Além disso, observou-se aumento significativo da expressão gênica para IL-1 β (**Figura 3e**) e uma tendência ao aumento na expressão dos genes para IL-6 e para NLRP3 (**Figura 3f, g**) no tecido adiposo visceral mesentérico dos animais HFD/Mtb comparados com os animais LFD/Mtb. Além disso, observou-se a correlação positiva significativa entre a expressão de IL-1 β e os níveis de glicose sérica (Área sob a curva) no grupo dos animais HFD/Mtb (**Figura 3h**).

Figura 3. Avaliação dos tecidos adiposos após infecção com *M. tuberculosis*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb) como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os tecidos adiposos visceral retroperitoneal e mesentérico foram coletados. Representação fotográfica dos tecidos adiposos retroperitoneal e mesentérico dos animais LFD e HFD infectados com *M. tuberculosis* (Mtb) (a). Peso do tecido adiposo visceral retroperitoneal (b) e mesentérico (c), fotomicrografias de secções de tecido adiposo retroperitoneal corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) em aumento de 200 x (d), análise da expressão gênica de IL-1 β (e), IL-6 (f) e NLRP3 (g) por PCR em tempo real a partir do tecido adiposo mesentérico e correlação entre IL-1 β e glicemia calculada pela área sob a curva (ASC) da aos 120 minutos (h). Os dados dos pesos de tecidos adiposos são representativos de dois experimentos independentes; os dados da expressão gênica de IL-1 β são representativos de três experimentos independentes; e os dados da expressão gênica de IL-6 e NLRP3 são

representativos de dois experimentos independentes; os dados da correlação são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média ($n = 3-9$). * = $P < 0.05$. Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.4. Detecção de IFN- γ no soro dos animais infectados ou não com *M. tuberculosis*

IFN- γ produzido, principalmente, por células T CD4⁺ tem papel importante na proteção contra a infecção por *M. tuberculosis* (Cooper, Dalton et al. 1993, Flynn, Chan et al. 1993). Além disso, a metainflamação na obesidade induzida por HFD é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF e IL-12 produzidas pelas células Th1 e M1, respectivamente (Lumeng, Bodzin et al. 2007, Schmidt, Weschenfelder et al. 2015). Desse modo, nós quantificamos os níveis séricos de IFN- γ . Como esperado, foi observado aumento significativo de IFN- γ no soro dos animais HFD comparado aos animais LFD não infectados (**Figura 4a**). Entretanto, não houve diferença nas concentrações séricas de IFN- γ detectadas nos grupos HFD/Mtb comparado ao grupo LFD/Mtb.

Figura 4. Avaliação dos níveis séricos de IFN- γ nos animais infectados ou não com *M. tuberculosis*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, foram avaliados os níveis séricos de IFN- γ . Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-6$). * = $P < 0.05$ Barra horizontal mostra a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.5. Inflamação pulmonar e número de bacilos nos animais obesos

Sabendo que o pulmão é o órgão-alvo da infecção por *M. tuberculosis*, e que a obesidade pode estar associada a doenças respiratórias (Mancuso, Gottschalk et al. 2002, Falagas and Kompoti 2006, Hsu, Aronoff et al. 2007), em seguida, avaliou-se a obesidade poderia influenciar na inflamação pulmonar e na resistência à infecção. A infecção por *M. tuberculosis* causou aumento no tamanho dos pulmões (**Figura 5a**). A análise histopatológica revelou que os animais HFD/Mtb apresentaram maior infiltrado perivascular e peribronquiolar quando comparados com aos animais LFD/Mtb (**Figura 5b**). Além disso, os pulmões dos animais HFD/Mtb apresentaram maior número de células e score histológico compatível com maior inflamação pulmonar quando comparados com o grupo LFD/Mtb (**Figura 5c, d**).

Em adição, os cortes histológicos de pulmões corados com Ziehl-Neelsen também revelaram maior número de bactérias nos pulmões e o ensaio de unidades formadoras de colônias (UFC) resultou em maior recuperação de carga bacteriana nos pulmões dos animais HFD/Mtb comparados aos animais LFD/Mtb (**Figura 5e, f**).

Esses resultados mostram que a obesidade agrava tanto a suscetibilidade à infecção como a inflamação pulmonar.

Figura 5. Inflamação pulmonar e carga bacteriana dos animais obesos. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados e processados. Imagens representativas do lóbulo esquerdo do pulmão de animais infectados ou não (a), fotomicrografias de seções de tecido pulmonar corados com Hematoxilina e Eosina (aumento de 200 x) (b), número total de células do pulmão (c), *score* histopatológico (0 = ausência de inflamação; 1 = inflamação leve; 2 = inflamação moderada; 3 = inflamação grave) (d), fotomicrografias de seções de tecido pulmonar corados com Ziehl-Neelsen (aumento de 400 x) (e) e ensaio de UFC a partir dos lóbulos mediano e inferior direito do pulmão (f). Os dados do número total de células do pulmão são representativos de dois experimentos independentes; os dados de *score* histopatológico e UFC são representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 8-12). * = $P < 0.05$ Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.6. Perfil de expressão de genes da resposta inflamatória e da resposta imune nos pulmões dos animais obesos e infectados

Uma vez que observamos acentuada inflamação nos pulmões dos animais obesos infectados (HFD/MTb), por meio do *PCR-array* procuramos investigar o maior número de genes (84 genes) relacionados com a resposta inflamatória e com a resposta imune na comorbidade obesidade e tuberculose. O *heatmap* mostrou que os pulmões do grupo HFD/Mtb apresentou um grande número de genes regulados positivamente (em vermelho) comparados aos demais grupos (**Figura 6a**). Além disso, foi notória a regulação dos genes envolvidos com resposta inflamatória, como IL-17, IFN- γ , TNF, IL-1 α , IL-1 β , que também são importantes no controle da infecção com *M. tuberculosis*, além dos genes NLRP3, caspase-1, IL-18, IL-6, e novamente a IL-1 β , que são importantes para indução da metainflamação e na resistência à insulina (Flynn, Chan et al. 1993, Flynn, Goldstein et al. 1995, Torrado and Cooper 2010, Mayer-Barber, Andrade et al. 2011, Stienstra, van Diepen et al. 2011, Vandanmagsar, Youm et al. 2011, Osborn and Olefsky 2012).

Figura 6. Expressão de genes da resposta inflamatória e da resposta imune no pulmão dos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram analisados quanto à expressão de 84 genes envolvidos na resposta inflamatória e da resposta imune por *PCR-array*. Os genes regulados positivamente apresentam-se em vermelho e os genes regulados negativamente em verde. As setas representam os genes comumente associados à resposta inflamatória durante a infecção com *M. tuberculosis* e/ou na obesidade. Os dados são representativos de um experimento, reproduzido duas vezes. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.7. Número de células CD4⁺ e CD8⁺ no pulmão dos animais obesos e infectados

Para determinar e mensurar o perfil de leucócitos que se encontrava nos pulmões de animais obesos e infectados (HFD/Mtb), primeiramente avaliamos as populações de células CD4⁺ e CD8⁺. As **Figura 7a e 7b** mostram a estratégia de *gate* e a análise representativa dos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença na porcentagem de células CD4⁺ (**Figura 7c**) e CD8⁺ (**Figura 7d**) entre os grupos infectados, porém, a análise do número total dessas populações revelou aumento significativo de células CD4⁺ e CD8⁺ nos pulmões de animais HFD/Mtb comparados com os animais LFD/Mtb (**Figura 7e, f**).

Figura 7. Número de células CD4⁺ e CD8⁺ nos pulmões dos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados, processados e submetidos ao protocolo de citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. Estratégia de *gate* (a), a análise representativa (b), porcentagem e o número total de células CD4⁺ (c, e) e CD8⁺ (d, f) foram obtidos. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 9-14). * = P < 0.05 Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.8. Análise de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17 no pulmão dos animais obesos e infectados

Considerando que houve aumento de células CD4⁺ no pulmão dos animais obesos infectados, a próxima etapa foi avaliar a atividade funcional dessa população celular.

As **Figuras 8a e 8b** ilustram a estratégia de *gate* e análise representativa das populações de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17, respectivamente. O controle de fluorescência (*fluorescence minus one* - FMO) para cada uma das populações é apresentado no Anexo 1. Foi observado aumento na porcentagem de células CD4⁺IFN- γ ⁺ (IFN- γ ⁺) (**Figura 8c**), CD4⁺IL-17⁺ (IL-17⁺) (**Figura 8d**) e CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ (IFN- γ ⁺IL-17⁺) (**Figura 8e**) nos pulmões de animais HFD/Mtb comparados aos animais LFD/Mtb. Conjuntamente, os resultados de histopatologia, expressão gênica, número de células CD4⁺ e células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e de IL-17 confirmam que a inflamação é maior nos pulmões de HFD/Mtb, como consequência da metainflamação induzida pela obesidade.

Figura 8. Análise de células CD4⁺ produtoras de IFN-γ e/ou IL-17 no pulmão dos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados, processados e analisados por citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. Estratégia de *gate* (a), análise representativa (b), e porcentagem das células CD4⁺IFN-γ⁺ (IFN-γ⁺) (c) CD4⁺IL-17⁺ (IL-17⁺) (d) e, CD4⁺IL-17⁺IFN-γ⁺ (IFN-γ⁺IL-17⁺) (e). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente ± erro padrão da média (n = 6-9). * = P < 0.05 Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.9. Análise de CD4⁺ Foxp3⁺ no pulmão dos animais obesos e infectados

Também analisamos a população de células Treg CD4⁺Foxp3⁺. As **Figuras 9a e 9b** mostram a estratégia de *gate* e análise representativa das células CD4⁺Foxp3⁺. O controle FMO é apresentado no Anexo 2. Foi encontrado aumento na porcentagem (**Figura 9c**) e número total (**Figura 9d**) de células CD4⁺Foxp3⁺ no pulmão dos animais HFD/Mtb quando comparados aos animais LFD/Mtb.

Com o propósito de associar o aumento das populações CD4⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ detectadas nos pulmões dos animais HFD/Mtb, foram estabelecidas correlações entre ambas as populações. A análise mostra correlação positiva significativa para células CD4⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ (**Figura 9e**).

Figura 9. Análise de CD4⁺ Foxp3⁺ no pulmão dos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) por *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados, processados e analisados por citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. Estratégia de *gate* (a), análise representativa (b), porcentagem (c), número total de células CD4⁺ Foxp3⁺ (d), e correlação de células CD4⁺ Foxp3⁺ e CD4⁺ (e). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 5-8). * = P < 0.05 Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.10. Avaliação das populações de células dendríticas CD11b⁺ e CD103⁺ nos pulmões de animais obesos e infectados

As células dendríticas apresentam papel determinante na ativação e diferenciação das células CD4⁺ e CD8⁺ em resposta à infecção por *M. tuberculosis*. Nosso grupo mostrou que as células CD11c⁺CD103⁺ dos pulmões de animais C57BL/6 infectados com *M. tuberculosis* induzem maior porcentagem de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-17 quando comparadas com as células CD11c⁺CD11b⁺ (Sérgio, Bertolini et al. 2015). As **Figura 10a e 10b** mostram, respectivamente, a estratégia de *gate* e a análise representativa usada para avaliar as populações mencionadas nos pulmões dos grupos experimentais. O controle FMO das populações é apresentado no Anexo 3.

As análises mostram que não houve diferença na porcentagem e no número de células CD11b⁺ (**Figura c, e**) e CD103⁺ (**Figura d, f**) entre os grupos HFD/Mtb e LFD/Mtb. Entretanto, foram observadas diferenças na porcentagem (**Figura 10c**) e no número total (**Figura 10e**) de células CD11b⁺ nos animais infectados em relação aos não infectados. No entanto, não houve diferença na porcentagem de células CD103⁺ (**Figura 10d**) entre os grupos experimentais, embora os pulmões dos animais infectados apresentassem maior número de células CD103⁺ (**Figura 10f**) em relação aos animais não infectados.

Figura 10. Avaliação das populações de células dendríticas CD11b⁺ e CD103⁺ nos pulmões de animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados, processados e analisados por citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. As populações de células CD11c⁺MHCII⁺ foram selecionadas e a partir desta população foram avaliadas as células CD11b⁺ ou CD103⁺. Estratégia de *gate* usada para avaliar as populações de células dendríticas (a), análise representativa das populações CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻ (CD11b⁺) e CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁻CD103⁺ (CD103⁺) (b). Porcentagem e número total de células dendríticas CD11b⁺ (c, e) e CD103⁺ (d, f). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 6-11). * = P < 0.05. Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.11. Avaliação da capacidade funcional das células dendríticas CD11b⁺ produtoras de IL-6 no pulmão de animais obesos e infectados

Como não houve diferenças nas populações de células dendríticas entre os grupos LFD e HFD infectados, foi avaliada a capacidade funcional das células dendríticas CD11b⁺, que se encontraram em maior porcentagem e número nos pulmões dos animais infectados comparados aos não infectados (**Figura 10c, e**). A partir da população duplo positiva: CD11c⁺ MHCII⁺, foi selecionada a população CD11b⁺IL-6⁺, como mostra a estratégia de *gate* (**Figura 11a**) e a análise representativa (**Figura 11b**). O controle FMO das populações é apresentado no Anexo 4. As análises mostraram que não houve diferença na porcentagem (**Figura 11c**) e no número de células CD11b⁺IL-6 (**Figura 11d**) entre os grupos de animais HFD/Mtb e LFD/Mtb.

Figura 11. Avaliação de células dendríticas CD11b⁺ produtoras de IL-6 no pulmão de animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados, processados e analisados por citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. As populações de células CD11c⁺MHCII⁺ foram selecionadas e a partir desta população foram avaliadas as células CD11b⁺IL-6⁺. Estratégia de *gate* (a), análise representativa das populações CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺IL-6⁺ (b), porcentagem (c) e o número total (d) de células dendríticas CD11b⁺IL-6⁺. Os dados são representativos de um experimento. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente ± erro padrão da média (n = 4-6). * = P < 0.05. Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.12. Avaliação de células dendríticas CD11b⁺ produtoras de IL-1β no pulmão de animais obesos e infectados

Em seguida, avaliamos a população de células dendríticas produtoras de IL-1β. A partir da população CD11c⁺MHCII⁺ foi selecionada a população de células CD11b⁺IL-1β⁺, como mostra a estratégia de *gate* (**Figura 12a**) e a análise representativa (**Figura 12b**). O controle FMO das populações é apresentado no Anexo 5. Não houve diferença na porcentagem (**Figura 12c**) e no número de total (**Figura 12d**) de células CD11b⁺IL-1β⁺ entre os grupos de animais HFD/Mtb e LFD/Mtb.

Figura 12. Avaliação da capacidade funcional das células dendríticas CD11b⁺ produtoras de IL-1β no pulmão de animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 WT foram alimentados e infectados ou não (-) por *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados, processados e analisados por citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. As populações de células CD11c⁺MHCII⁺ foram selecionadas e a partir desta população foram avaliadas as células CD11b⁺IL-6⁺. Estratégia de *gate* (a), análise representativa das populações CD11c⁺MHCII⁺ e CD11b⁺IL-1β⁺ (b), porcentagem (c) e o número total (d) de células dendríticas CD11b⁺IL-1β⁺ foram analisadas. Os dados são representativos de um experimento. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente ± erro padrão da média (n = 4-5). * = P < 0.05 Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.13. Avaliação de células dendríticas nos linfonodos dos animais obesos e infectados

Paralelamente, foi avaliado as populações de células dendríticas nos linfonodos linfáticos do mediastino dos animais infectados. A partir da população de células CD11c⁺, foram selecionadas as populações CD8α⁺MHCII⁺ e CD8α⁻MHCII⁺ para considerar as populações de células dendríticas convencionais (cDC): cDC1 (CD8α⁺MHCII⁺CD11b⁻) e cDC2 (CD8α⁻MHCII⁺CD11b⁺) produtoras de IL-6. A estratégia de *gate* (**Figura 13a**) mostra como foram obtidas as populações de cDC1 e cDC2 produtoras de IL-6. A **Figura 13b** mostra a análise representativa das populações de cDC1 e cDC2 produtoras de IL-6 e, no Anexo 6 é apresentado o controle FMO das populações mencionadas.

Não houve diferença na porcentagem (**Figura 13c**) e no número total (**Figura 13e**) de células cDC1 produtoras de IL-6 entre os grupos infectados. Entretanto, houve aumento na porcentagem (**Figura 13d**), mas não no número (**Figura 13f**) de cDC2 produtoras de IL-6 nos linfonodos de animais HFD/Mtb em relação aos animais LFD/Mtb.

Figura 13. Avaliação de células dendríticas nos linfonodos dos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) por *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os linfonodos do mediastino foram coletados, processados e submetidos ao protocolo de citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. A partir da população de células CD11c⁺, foram selecionadas as populações CD8⁺MHCII⁺ e CD8⁻MHCII⁺, e em seguida, as populações cDC1 (CD8⁺MHCII⁺CD11b⁻) e cDC2 (CD8⁻MHCII⁺CD11b⁺) produtoras de IL-6: CD8⁺IL-6⁺ e CD11b⁺IL-6⁺, respectivamente. Estratégia de *gate* (a), análise representativa das populações cDC1 e cDC2 produtoras de IL-6 para os grupos de animais LFD e HFD infectados (b), porcentagem e número total de células CD8⁺IL-6⁺ (c, e) e CD11b⁺IL-6⁺ (d, f). Os dados são representativos de um experimento. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente ± erro padrão da média (n = 3-5). * = P < 0.05 Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.14. Avaliação de macrófagos *M1-like* nos pulmões de animais obesos e infectados

A partir da população de células mielóides F4/80⁺, analisamos duas populações de macrófagos: CD11c⁺CD11b^{low} e CD11c⁺CD11b⁺. Além disso, foi empregado o marcador CD16/32⁺ para caracterizar a população *M1-like* nessas duas populações. A **Figura 14a** mostra a estratégia de *gate* e a **Figura 14b** a análise representativa usada para caracterizar as populações de macrófagos. O controle FMO das populações é apresentado no Anexo 7.

Não houve diferença nas populações CD11c⁺CD11b^{low} (**Figura 14c, e**) e CD11c⁺CD11b⁺ (**Figura 14d, f**) entre os grupos HFD/Mtb e LFD/Mtb. Entretanto, dentro da população CD11c⁺CD11b^{low} foi observado maior número total (**Figura 14c**) de macrófagos *M1-like* (CD16/32⁺) nos pulmões de animais infectados em relação não infectados, porém, não houve diferença na porcentagem dessas células (**Figura 14e**). Além disso, dentro da população CD11c⁺CD11b⁺ foi observada maior porcentagem (**Figura 14d**) e número total (**Figura 14f**) de macrófagos *M1-like* nos animais infectados comparados aos não infectados. Nos grupos infectados, HFD/Mtb e LFD/Mtb, não foram observadas diferenças na população *M1-like* (CD16/32⁺).

Não detectamos macrófagos M2, caracterizados pela expressão de CD206 nas populações acima descritas, nos pulmões de ambos os grupos infectados, HFD/Mtb e LFD/Mtb (dados não mostrados).

Figura 14. Avaliação de macrófagos *M1-like* nos pulmões de animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados e as suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. As populações de células F4/80⁺ foram selecionadas e, a partir desta população foram avaliadas as células CD11c⁺ CD11b^{low} e CD11c⁺ CD11b⁺. Estratégia de *gate* para macrófagos (a). Porcentagem (c) e o número total (e) de células CD16/32⁺ (M1) dentro da população CD11c⁺ CD11b^{low}. Porcentagem (d) e o número total (f) de células CD16/32⁺ (M1) dentro da população CD11c⁺ CD11b⁺. Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 4-7). * = P < 0.05 Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.15. Avaliação de monócitos e neutrófilos nos pulmões dos animais obesos e infectados

Para completar a análise dos leucócitos da imunidade inata, avaliamos as populações de monócitos e neutrófilos nos pulmões de animais dos grupos LFD e HFD infectados com *M. tuberculosis*. A **Figura 15a** representa a estratégia de *gate* empregada para selecionar as populações de monócitos ($CD11b^+Ly6C^+$) e neutrófilos ($CD11b^+Ly6G^+$). A **Figura 15b** mostra a análise representativa dos grupos experimentais e, no Anexo 8, o controle FMO para as populações mencionadas.

Foi observado maior número total de monócitos (**Figura 15e**) e neutrófilos (**Figura 15f**) no grupo de animais infectados em relação aos animais não infectados. Não houve diferença nas frequências dessas células entre os 4 grupos experimentais (**Figura 15c, d**). Também não encontramos diferenças nas populações de monócitos (**Figura 15c, e**) e neutrófilos entre os grupos HFD/Mtb e LFD/Mtb (**Figura 15d, f**).

Figura 15. Avaliação de monócitos e neutrófilos nos pulmões dos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados e as suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Foram adquiridos, no mínimo, 100.000 eventos por amostra. Estratégia de *gate* analisada para as populações de monócitos CD11b⁺Ly6C⁺ (Ly6C⁺) e CD11b⁺Ly6G⁺ (Ly6G⁺) (a). Análise representativa dos grupos experimentais (b), porcentagem e o número total de Ly6C⁺ (c, e) ou Ly6G⁺ (d, f) respectivamente. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 5-11). * = P < 0.05. Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

O conjunto de dados apresentados até momento com animais obesos e infectados mostrou aumento da carga bacteriana, maior inflamação pulmonar, maior porcentagem de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17, aumento de células Treg nos pulmões, e da população de cDC2 (CD8 α MHCII⁺CD11b⁺) produtora de IL-6 nos linfonodos, comparados aos animais alimentados com dieta LFD e infectados. Nesse contexto, qual é ou são os mecanismos que estariam influenciando o aumento da inflamação pulmonar e o aumento da suscetibilidade à infecção decorrente da obesidade? Para responder essa questão, nós escolhemos investigar o papel do receptor NLRP3 e da microbiota intestinal.

4.16. Avaliação dos parâmetros da obesidade nos animais deficientes para NLRP3 antes e após a infecção com *M. tuberculosis*

Como a análise por *PCR array* (**Figura 6**) mostrou aumento da expressão gênica de NLRP3 nos pulmões dos animais HFD/Mtb, e NLRP3 é uma molécula chave relacionada com a obesidade e com a resistência à insulina (Stienstra, van Diepen et al. 2011, Vandanmagsar, Youm et al. 2011), embora não parece ser essencial para a resposta contra *M. tuberculosis in vivo* (Dorhoi, Nouailles et al. 2012), escolhemos NLRP3 como alvo para indução da metainflamação e da inflamação pulmonar na comorbidade tuberculose e obesidade.

Para investigar o envolvimento de NLRP3, camundongos C57BL/6 (WT) e deficientes para NLRP3 (NLRP3^{-/-}) foram alimentados com dieta LFD e HFD por 60 dias (**Figura 16a**). Ambos os grupos alimentados com HFD, WT e NLRP3^{-/-}, exibiram aumento significativo na massa corporal (**Figura 16b, c**) e foram intolerantes à glicose quando comparados ao grupo WT LFD e NLRP3^{-/-} LFD (**Figura 16d**). No entanto, não houve diferença nos níveis de glicemia entre os grupos NLRP3^{-/-} HFD e WT HFD (**Figura 16d**).

Após a infecção e totalizando 90 dias de dieta (**Figura 17a**), os animais WT HFD e NLRP3^{-/-} HFD permaneceram obesos (**Figura 17b**), com maior aumento do peso dos tecidos adiposos mesentérico (**Figura 17c**) e retroperitoneal (**Figura 17d**). Além disso, foram intolerantes à glicose quando comparados aos respectivos grupos controle (LFD) (**Figura 17f, g**). Como esperado o grupo de animais WT HFD infectados (WT HFD/Mtb) apresentaram diminuição da insulina quando comparados ao grupo WT LFD infectados (WT LFD/Mtb) (**Figura 17e**), mostrando uma vez mais deficiência na produção de insulina, entretanto não houve diferença nos níveis de insulina entre os grupos NLRP3^{-/-} LFD e Nlrp3^{-/-} HFD infectados (**Figura 17e**).

Esses resultados mostram que a ausência de NLRP3 não afetou o desenvolvimento da obesidade decorrente da dieta hiperlipídica, nem foi associada com redução da glicemia, como previamente descrito por Kim e colaboradores (Kim, Lee et al. 2014).

Figura 16. Avaliação dos parâmetros da obesidade nos animais deficientes para NLRP3 antes da infecção com *M. tuberculosis*. Delineamento experimental para indução de obesidade em camundongos C57BL/6 (WT) e NLRP3^{-/-} (a). Representação fotográfica dos animais WT e NLRP3^{-/-} alimentados com dieta LFD e HFD (b). Massa corporal após 60 dias de alimentação (c) e glicemia de jejum de 6 horas (d). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 8-14). * = P < 0.05. Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos.

Figura 17. Manutenção dos parâmetros de obesidade nos animais deficientes para NLRP3 após a infecção por *M. tuberculosis*. Camundongos C57BL/6 (WT) e NLRP3^{-/-} foram alimentados com dieta LFD ou HFD durante 60 dias, infectados com *M. tuberculosis* (Mtb) e avaliados 30 dias pós-infecção (a). Massa corpórea antes e após infecção (b), pesos do tecido adiposo mesentérico (c) e retroperitoneal (d), insulina sérica (e), teste de intolerância a glicose (f) e área sob a curva (ASC) da glicemia calculada aos 120 minutos (g). Os dados de massa corpórea, tecidos adiposos são representativos de dois experimentos independentes; os dados de insulina e glicemia são dados de um experimento. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 4-6). * = P < 0.05. Barras horizontais mostram a diferença entre os grupos. * representa diferença estatisticamente significativa entre WT LFD e WT HFD; # representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos NLRP3^{-/-} LFD e NLRP3^{-/-} HFD; • representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos NLRP3^{-/-} HFD e WT HFD. LFD=não obesos; HFD=obesos; WT LFD/Mtb=não obesos infectados; WT HFD/Mtb=obesos infectados; NLRP3^{-/-}/LFD/Mtb = não obesos deficientes para NLRP3 e infectados; NLRP3^{-/-}/HFD/Mtb = obesos deficientes para NLRP3 e infectados.

4.17. Avaliação da carga bacteriana e da inflamação nos pulmões de animais NLRP3^{-/-} HFD infectados

Os resultados mostram que animais WT obesos foram suscetíveis à infecção comparados aos animais WT alimentados com dieta LFD, confirmando novamente que a obesidade afeta negativamente a infecção por *M. tuberculosis* (**Figura 18a**). De acordo com nossa hipótese, a recuperação de bacilos nos pulmões de animais *Nlrp3*^{-/-} HFD infectados por *M. tuberculosis* (NLRP3^{-/-} HFD/Mtb) foi significativamente menor que aquela detectada nos animais WT HFD/Mtb, como se observa na **Figura 18a**. Não houve diferença entre os grupos NLRP3^{-/-} LFD/Mtb e NLRP3^{-/-} HFD/Mtb. Entretanto, foi observado um aumento significativo de UFC nos animais NLRP3^{-/-} LFD/Mtb comparado ao grupo WT LFD/Mtb. Esse último resultado foi diferente dos dados descritos na literatura, quando animais NLRP3^{-/-} infectados com *M. tuberculosis* controlaram a infecção pulmonar (Dorhoi, Nouailles et al. 2012).

A análise histopatológica (**Figura 18b**) e o *score* histopatológico (**Figura 18c**), evidenciam a inflamação pulmonar e intensidade da mesma mostrando que o grupo NLRP3^{-/-} HFD/Mtb apresentou redução do infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo WT HFD/Mtb. Esses resultados sugerem que NLRP3 pode ser uma molécula que desempenha papel crítico no aumento da suscetibilidade e da inflamação pulmonar durante a infecção em decorrência da obesidade.

Portanto, diminuição do número de UFC e da inflamação pulmonar corroboram nossa hipótese de que na ausência de NLRP3, os animais obesos são mais resistentes em decorrência da redução na inflamação pulmonar.

Figura 18. Avaliação da carga bacteriana e da inflamação nos pulmões de animais NLRP3^{-/-} HFD infectados. Camundongos C57BL/6 e *Nlrp3*^{-/-} foram alimentados com dieta LFD ou HFD durante 60 dias, e infectados por *M. tuberculosis* (Mtb). Trinta dias após infecção, foi realizado o ensaio de unidades formadoras de colônia (UFC) a partir dos lóbulos mediano e inferior direito do pulmão (a). Análise histopatológica representativa (magnitude 200 x, esquerda e 400 x, direita) (b). *Score* histopatológico (0 = ausência de inflamação; 1 = inflamação leve; 2 = inflamação moderada; 3 = inflamação grave) (c). Os dados de UFC são representativos de dois experimentos independentes; os dados de *score* histológico de um experimento. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 7-12). * = P < 0.05. Barras horizontais mostram a diferença entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; WT HFD/Mtb=obesos infectados; NLRP3^{-/-}/LFD/Mtb = não obesos deficientes para NLRP3 e infectados; NLRP3^{-/-}/HFD/Mtb = obesos deficientes para NLRP3 e infectados.

4.18. Avaliação das células CD4⁺ produtoras de IFN- γ nos pulmões de animais NLRP3^{-/-} obesos e infectados

Como a ausência de NLRP3 foi promovendo redução na inflamação pulmonar dos animais HFD/Mtb, nós nos questionamos se esse achado estaria associado também com diminuição na frequência de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ nos pulmões.

As **Figuras 19a e 19b** representam a estratégia de *gate* e a análise representativa da população CD4⁺IFN- γ ⁺ dos grupos experimentais avaliados. O controle FMO é apresentado no Anexo 9.

Como esperado, confirmamos o aumento de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ nos pulmões dos animais WT HFD/Mtb quando comparados ao grupo WT LFD/Mtb, como já descrito e observado na **Figura 8**. Entretanto, observamos diminuição no número total, mas não na porcentagem de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ ⁺ nos pulmões dos animais NLRP3^{-/-} HFD/Mtb comparados aos animais WT HFD/Mtb.

Figura 19. Avaliação das células CD4⁺ produtoras de IFN-γ nos pulmões de animais NLRP3^{-/-} obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 WT e *Nlrp3*^{-/-} foram alimentados e infectados como descrito na figura 17a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados, processados e submetidos ao protocolo de marcação para citometria de fluxo. Estratégia de *gate* (a), análise representativa (b), porcentagem (c) e número total (d) de células CD4⁺ produtoras de IFN-γ. Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente ± erro padrão da média (n = 3-6). * = P < 0.05. Barras horizontais mostram a diferença entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; WT HFD/Mtb=obesos infectados; NLRP3^{-/-}/LFD/Mtb = não obesos deficientes para NLRP3 e infectados; NLRP3^{-/-}/HFD/Mtb = obesos deficientes para NLRP3 e infectados.

4.19. Avaliação da microbiota intestinal nos animais obesos e infectados

Evidências experimentais mostram que a obesidade induzida pela dieta promove disbiose e inflamação no trato intestinal (Kim, Gu et al. 2012). Nós nos questionamos se a ocorrência da disbiose decorrente da obesidade poderia ser associada ao aumento da resposta inflamatória observada nos pulmões. A partir do DNA bacteriano extraído das fezes dos animais, foi detectado, por meio da análise da expressão gênica, a presença das bactérias que pertencem aos Filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria.

A **Figura 20a** mostra que os animais LFD infectados (LFD/Mtb) ou não (LFD) apresentaram aumento significativo na expressão relativa do Filo Bacteroidetes comparados aos animais HFD/Mtb e HFD, respectivamente. Como esperado, os animais HFD infectados (HFD/Mtb) ou não (HFD) apresentaram aumento na expressão relativa do Filo Firmicutes comparados aos animais LFD/Mtb e LFD, respectivamente. Além disso, houve aumento do Filo Firmicutes no grupo HFD/Mtb quando comparado ao grupo HFD (**Figura 20b**). A razão dos Filos Firmicutes/Bacteroidetes revelou aumento significativo nos animais HFD/Mtb comparados aos animais LFD/Mtb (**Figura 20c**). Houve diminuição do Filo Proteobacteria nos animais HFD/Mtb quando comparado aos animais LFD/Mtb. Porém, este mesmo Filo estava aumentado quando comparados os grupos HFD/Mtb e HFD (**Figura 20d**). Em relação ao Filo Actinobacteria, não houve diferença nos grupos infectados, enquanto observou-se diminuição no grupo de animais HFD/Mtb quando comparado aos animais HFD (**Figura 20e**). Os resultados mostram que houve disbiose decorrente da obesidade nos animais infectados.

Figura 20. Avaliação da microbiota intestinal nos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, as fezes foram coletadas, processadas e o DNA bacteriano extraído para detecção dos Filos bacterianos por PCR em tempo Real. Expressão gênica relativa: Bacteroidetes (a), Firmicutes (b), razão de Firmicutes/Bacteroidetes (c), Proteobacteria (d), Actinobacteria (e). Os dados são representativos de dois a três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-6$). *. $P < 0.05$. Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.20. Dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nos animais obesos e infectados

É descrito que uma dieta rica em fibras é metabolizada pela microbiota intestinal para gerar AGCC (Puddu, Sanguineti et al. 2014, Schroeder and Bäckhed 2016). Os AGCC, principalmente participam na diferenciação de células T reguladoras (Arpaia, Campbell et al. 2013, Furusawa, Obata et al. 2013) e células Th1 (Kespohl, Vachharajani et al. 2017), e portanto, podem interferir positiva ou negativamente na resposta inflamatória. Nesse contexto, foi analisado as concentrações dos AGCC nas fezes dos

animais obesos ou não, e infectados ou não com *M. tuberculosis* para estabelecer uma associação entre a disbiose encontrada nos nossos resultados com os AGCC, que poderiam influenciar a resposta inflamatória.

Observamos diminuição na porcentagem de acetato (**Figura 23a**) e propionato (**Figura 23b**) e aumento de butirato (**Figura 23c**) nos animais do grupo HFD/Mtb comparados aos animais LFD/Mtb.

Figura 21 Dosagem dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, as fezes foram coletadas e processadas para análise da porcentagem de AGCC. Porcentagem de acetato (a), propionato (b) e butirato (c). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 4-6). * = $P < 0.05$ Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.21. Avaliação da expressão de proteínas de junção celular no intestino dos animais obesos e infectados

A disbiose associada a uma obesidade induzida pela dieta hiperlipídica pode aumentar a permeabilidade da barreira intestinal, facilitando a translocação bacteriana para outros órgãos periféricos (Cani, Amar et al. 2007, Cani, Bibiloni et al. 2008, Samuelson, Welsh et al. 2015). Nesse contexto, foi avaliada a expressão das proteínas de junções firmes (*Tight junction*) responsáveis pela manutenção da barreira epitelial, da integridade celular e para o transporte de solutos (Wang, Mumm et al. 2017). A

claudina-2 é uma proteína que forma canais para manter o controle da passagem de solutos através do espaço paracelular, o aumento dessa proteína, bem como a diminuição de ZO-1 e ocludina, proteínas responsáveis da adesão celular, estão associadas a permeabilidade da membrana intestinal (Ahmad, Rah et al. 2017). Por PCR em tempo real, foram detectados os genes das junções celulares firmes: claudina-2, *zonula occluden* (ZO-1) e ocludina, expressos na parte distal do íleo. Observou-se aumento da expressão relativa de claudina-2 no intestino dos animais HFD/Mtb quando comparados aos animais LFD/Mtb (**Figura 22a**). Não houve diferença na expressão relativa de ZO-1 e de ocludina comparando os grupos de animais infectados (**Figura 22b**). O aumento na expressão gênica elevada da claudina-2 no intestino dos animais HFD/Mtb sugere uma possível translocação bacteriana do intestino para o pulmão.

Figura 22. Avaliação da expressão gênica de proteínas de junção celular no intestino dos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, a parte distal do íleo foi coletada, processada e submetida à análise da expressão relativa de claudina-2 (a) *Zonula occluden* (ZO-1) (b) e ocludina (c) por PCR em tempo real. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média (n = 7-10).). * = P < 0.05 Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

4.22. Avaliação da microbiota pulmonar nos animais obesos e infectados

Os estudos mostraram que a disbiose intestinal pode atingir outros tecidos periféricos como fígado, cérebro e, inclusive, os pulmões (Schroeder and Bäckhed 2016). Uma vez que no presente estudo foi encontrada disbiose intestinal decorrente da obesidade, com aumento de Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes (**Figura 20a, b**), aumento de butirato (**Figura 21c**) e aumento da expressão de claudina, sugerindo uma alteração da barreira intestinal e possível translocação bacteriana (**Figura 22a**), o passo seguinte foi avaliar a microbiota pulmonar. Observou-se aumento significativo da expressão relativa dos Filos Bacteroidetes (**Figura 23a**) e Firmicutes (**Figura 23b**) nos pulmões de animais HFD/Mtb comparados aos animais LFD/Mtb. No entanto, houve diminuição do Filo Proteobacteria nos pulmões de animais HFD/Mtb quando comparados aos grupos LFD/Mtb e HFD (**Figura 23c**). Além disso, houve aumento do Filo Actinobacteria nos pulmões de animais HFD/Mtb comparados aos animais LFD/Mtb,. No entanto, a expressão do Filo Actinobacteria estava reduzida no grupo HFD/Mtb comparado ao grupo HFD (**Figura 23d**). Os resultados sugerem que ocorre uma disbiose pulmonar que foi parcialmente semelhante observada na disbiose intestinal (**Figura 20**), o que sugere uma possível translocação bacteriana.

Figura 23. Avaliação da microbiota pulmonar nos animais obesos e infectados. Camundongos C57BL/6 foram alimentados e infectados ou não (-) com *M. tuberculosis* (Mtb), como descrito na figura 2a. Trinta dias após infecção, os pulmões foram coletados, processados e o DNA bacteriano foi extraído para detecção dos Filos por PCR em tempo Real. Expressão relativa para detecção dos Filos Bacteroidetes (a), Firmicutes (b), Proteobacteria (c) e Actinobacteria (d). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente $\pm$ erro padrão da média ($n = 4-8$). *. $P < 0.05$ Barras horizontais mostram a diferença estatisticamente significativa entre os grupos. LFD = não obesos; HFD = obesos; LFD/Mtb = não obesos e infectados; HFD/Mtb = obesos e infectados.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o impacto da obesidade na infecção por *M. tuberculosis* em animais submetidos à alimentação com dieta hiperlipídica (HFD, *High Fat Diet*). Estudos epidemiológicos mostram que o sobrepeso ou aumento no índice de massa corpórea podem diminuir o risco de desenvolver TB (Leung, Lam et al. 2007, Hanrahan, Golub et al. 2010, Yen, Hu et al. 2017). No entanto, um único estudo com animais deficientes em leptina, infectados com *M. tuberculosis*, mostrou que a obesidade, decorrente da ausência de leptina, aumentou a suscetibilidade à infecção (Wieland, Florquin et al. 2005). A obesidade é um grande problema de saúde mundial nos dias atuais, podendo desencadear diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, além afetar também o desenvolvimento de doenças pulmonares (Mancuso, Gottschalk et al. 2002, Mancuso 2010, Kanneganti and Dixit 2012, Mancuso 2013). Foi nesse contexto que levantamos a hipótese do presente estudo, de que a obesidade afetaria negativamente a suscetibilidade bem como a inflamação pulmonar durante a infecção com *M. tuberculosis*.

Nossos resultados mostram que após a infecção com *M. tuberculosis*, os animais alimentados com dieta hiperlipídica (HFD/Mtb) mantiveram-se obesos, foram intolerantes à glicose com uma diminuição dos níveis de insulina e apresentaram aumento da expressão gênica de IL-1 β no tecido adiposo mesentérico visceral comparados aos animais LFD infectados (LFD/Mtb).

A diminuição dos níveis de insulina sérica nos animais HFD/Mtb sugere que eles tornaram-se pre-diabéticos, possivelmente pela deficiência da capacidade secretória das células beta pancreáticas para produzir insulina e ter a capacidade de controlar a glicose (Wu, Wu et al. 2013).

Na obesidade, o tecido adiposo branco representa um ambiente pró-inflamatório, com aumento de macrófagos M1 produtores de IL-1 β , citocina associada com doenças metabólicas, como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Kanneganti and Dixit 2012, Osborn and Olefsky 2012, Kwok, Lam et al. 2016). Além disso, sabe-se que as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF encontram-se elevadas no tecido adiposo na condição de obesidade e podem reduzir a sensibilidade à insulina (Bing 2015, Kwok, Lam et al. 2016,

Rheinheimer, de Souza et al. 2017). A IL-1 β inibe diretamente a sinalização da insulina pela redução da fosforilação de tirosina no receptor de insulina (IRS-1), de forma que regula negativamente a expressão do gene IRS-1, promovendo a resistência à insulina (Jager, Grémeaux et al. 2007). Por outro lado, Dror e colaboradores identificaram que em condições normais, a IL-1 β pode manter a homeostase da glicose, conduzindo à efetiva secreção de insulina pós-prandial pelas células β pancreáticas (Dror, Dalmas et al. 2017). Nós mostramos que o aumento na expressão gênica de IL-1 β correlaciona-se positivamente com os níveis de glicose sérica detectados nos animais do grupo HFD/Mtb. Assim, descrevemos, pela primeira vez, que os animais obesos e infectados com *M. tuberculosis* são intolerantes à glicose, e que a IL-1 β , expressa como consequência da obesidade e/ou da infecção pela micobactéria, está associada com a intolerância à glicose também nessa comorbidade, o que confirma resultados de estudos já descritos relacionando o papel desta citocina com a hiperglicemia. Um estudo *in vitro* mostrou que macrófagos humanos derivados de indivíduos saudáveis, infectados com *M. tuberculosis* e estimulados em condições hiperglicêmicas, secretam elevadas concentrações de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 (Lachmandas, Vrieling et al. 2015). Esse estudo mostra que não somente a IL-1 β participa do processo de intolerância à glicose, mas também a hiperglicemia exerce um papel proinflamatório. Além, disso, este estudo também contribui para reforçar nosso resultado de que o aumento de glicose circulante é um fator que promove o aumento na produção de IL-1 β , sendo esta citocina associada com a metainflamação.

A IL-1 β também é um mediador inflamatório importante para os mecanismos de defesa contra a infecção por *M. tuberculosis* (Dorhoi, Nouailles et al. 2012, Latz, Xiao et al. 2013). Entretanto, em excesso, pode agravar a inflamação pulmonar (Mayer-Barber, Barber et al. 2010). Nosso grupo encontrou aumento significativo de IL-1 β nos pulmões de animais HFD/Mtb comparado com LFD/Mtb (dados não mostrados), e nós mostramos, no presente estudo, aumento da expressão gênica para IL-1 β nos pulmões dos animais HFD/Mtb comparado com o grupo LFD/Mtb. Assim, a IL-1 β pode estar elevada como consequência da metainflamação decorrente da obesidade, sendo expressa no tecido adiposo e também nos pulmões, e pode participar do aumento da inflamação pulmonar aqui reportada, e consequentemente, agravar a suscetibilidade à infecção. Além

disso, também encontramos aumento significativo de IFN- γ no soro do grupo HFD comparado ao grupo LFD. Porém, não encontramos diferenças nos grupos infectados (HFD/Mtb e LFD/Mtb). Esse resultado sugere que durante a infecção, a produção de IFN- γ passaria a ser maior nos pulmões, órgão-alvo da infecção, enquanto a produção sistêmica seria menor. Isso vai ao encontro do conceito de metainflamação, que é uma inflamação de baixo grau quando comparada com a inflamação induzida por antígenos oriundos de agentes infecciosos (Lumeng 2013).

Estudos em seres humanos e estudos empregando o modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD) ressaltam que a obesidade contribui para o aumento de complicações respiratórias de origem infecciosa (Bochicchio, Joshi et al. 2006, Mancuso 2010, Mancuso 2013). A gordura abdominal de indivíduos obesos pode comprometer o mecanismo muscular pulmonar por meio da diminuição do volume dos pulmões, atenuando a eficiência respiratória (Falagas and Kompoti 2006, Mancuso 2010). Além disso, a obesidade desencadeia alterações metabólicas, as quais interferem nas funções da resposta imunológica e prejudicam a homeostase vascular dos pulmões (Shah, Romero et al. 2015). Em conjunto, tais fatores causam redução da capacidade de defesa do hospedeiro contra patógenos (Kanneganti and Dixit 2012, Mancuso 2013, Shah, Romero et al. 2015), como é o caso dos animais obesos infectados pelo vírus da influenza A (H1N1) (Smith, Sheridan et al. 2009, Karlsson, Sheridan et al. 2010, Easterbrook, Dunfee et al. 2011, O'Brien, Vogel et al. 2012), ou por bactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli* que exibiram aumento da patologia pulmonar (Mancuso, Gottschalk et al. 2002, Hsu, Aronoff et al. 2007, Wan, Yuan et al. 2016). Um de nossos resultados centrais é justamente o aumento da suscetibilidade e da inflamação nos pulmões de animais obesos e infectados com *M. tuberculosis*, suportando as evidências de redução da capacidade de defesa do hospedeiro contra patógenos na condição de obesidade (Kanneganti and Dixit 2012, Mancuso 2013, Shah, Romero et al. 2015) e corroborando o estudo realizado com animais deficientes em leptina e infectados com *M. tuberculosis* (Wieland, Florquin et al. 2005), como descrito anteriormente.

A partir desses achados, embasamos nossa hipótese no fato de que o aumento na inflamação pulmonar decorrente da metainflamação induzida pela obesidade seria o fator

determinante na progressão da infecção (ou aumento da suscetibilidade). Com o propósito de encontrar mediadores que pudessem fortalecer nossa hipótese de investigação, avaliamos um perfil amplo de expressão de genes relacionados com inflamação, imunidade inata e imunidade adaptativa. Vários genes foram regulados positivamente nos pulmões de animais do grupo HFD/Mtb comparados aos demais grupos experimentais (IL-17, IFN- γ , TNF, IL-1 α , IL-1 β , NLRP3, Foxp3, IL-10). A maioria desses genes regulados positivamente (IL-17, IFN- γ , TNF, IL-1 α , IL-1 β) está associada ao controle da infecção por *M. tuberculosis* (Cooper, Dalton et al. 1993, Flynn, Chan et al. 1993, Flynn, Goldstein et al. 1995, Cooper, Magram et al. 1997, Mayer-Barber, Andrade et al. 2011), além participam da metainflamação induzida pela obesidade e na indução de resistência à insulina (Stienstra, van Diepen et al. 2011, Vandanmagsar, Youm et al. 2011, Osborn and Olefsky 2012, Schmidt, Weschenfelder et al. 2015). Em adição, IL-17, IFN- γ e IL-1 β , que desempenham papel protetor na TB, também podem exercer efeito deletério ao hospedeiro. Isso é evidente, principalmente, para IFN- γ , que pode representar uma faca de dois gumes na TB, considerando não apenas as concentrações elevadas, mas também a coexpressão de IFN- γ com mediadores que modulam negativamente os mecanismos microbicidas, como IL-10, sintetizada por células Treg ou por macrófagos.

Estudos em animais e pessoas com TB, mostraram que aumento dos níveis de IFN- γ contribui para disseminação da infecção por *M. tuberculosis* e progressão da doença (Tsao, Huang et al. 2002, O'Garra, Redford et al. 2013, Nunes-Alves, Booty et al. 2014, Sakai, Kauffman et al. 2016). Em uma revisão publicada, recentemente, Kumar e colaboradores descrevem claramente o papel dubio do IFN- γ na TB (Kumar 2017). Eles descreveram o papel patológico de IFN- γ na TB em pacientes com HIV, que após ser tratados com terapia antirretroviral passam apresentar o síndrome da reconstituição imunológica, assim, apresentaram um aumento da produção de IFN- γ que não é suficiente para controlar a infecção (Kumar 2017).

Diante do resultado de expressão gênica nos pulmões e frente ao contexto exposto, quantificamos os linfócitos T e determinamos a atividade funcional dos linfócitos CD4⁺ com relação à produção de IFN- γ e/ou de IL-17. O aumento do número total de células CD4⁺, CD8⁺, e o aumento de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-

17 nos pulmões dos animais do grupo HFD/Mtb, comparados aos animais LFD/Mtb, representam forte indício de que nossa hipótese de aumento da inflamação pulmonar acentua a suscetibilidade à infecção.

O mesmo papel dúbio desempenhado pelo IFN- γ pode ser atribuído às células Th17, dependendo das concentrações de IL-17 produzidas nos pulmões. O aumento na expressão de IL-17 resulta em patologia pulmonar, por aumentar a hipertrofia epitelial e a presença de macrófagos multinucleados (Park, Li et al. 2005). Torrado e colaboradores mostraram que o excesso de Th17 pode induzir lesão tecidual por estimular o recrutamento de neutrófilos e de células Th1 (Torrado and Cooper 2010). Ainda assim, o papel da resposta Th17/IL-17 em pacientes com TB é contraditório. A redução de níveis de IL-17 no sangue sugere que as células Th17 desempenham papel protetor, por estarem associadas com alta mortalidade dos pacientes com TB (Chen, Chin et al. 2011). Do contrário, Jurado e colaboradores mostraram que as células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-17, obtidas de sangue periférico de pacientes com TB, estão diretamente associadas com a patologia da doença (Jurado, Pasquinelli et al. 2012). Esse achado clínico corrobora o aumento de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ ⁺ e IL-17⁺ nos pulmões dos animais HFD/Mtb comparados ao grupo LFD/Mtb, e sua associação com a imunopatologia pulmonar observada no presente estudo. Desta forma, as populações de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17 parecem associadas com o aumento da inflamação pulmonar, e possivelmente, com a acentuada suscetibilidade decorrente da obesidade durante a infecção com *M. tuberculosis*.

O aumento da resposta de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-17⁺ obviamente nos fez considerar uma falha nos mecanismos regulação da resposta imune. No entanto, detectamos aumento significativo na frequência e no número de células CD4⁺Foxp3⁺, bem como uma correlação positiva de células CD4⁺ e células CD4⁺Foxp3⁺ nos pulmões de animais do grupo HFD/Mtb comparado ao grupo LFD/Mtb. Esses resultados mostram que o aumento da inflamação pulmonar não pode ser atribuído à falha no influxo de células Treg. Porém, poderia estar associado com menor capacidade supressora das células CD4⁺Foxp3⁺ encontradas nos pulmões de animais obesos e infectados. Isso permanece para ser investigado na comorbidade obesidade e tuberculose. Consideramos também que embora as células Treg tenham infiltrado em maior número nos pulmões de

animais do grupo HFD/Mtb, comparado ao grupo LFD/Mtb, é possível que a frequência de células Treg ainda seja baixa para modular a resposta efetora das células $CD4^+$ produtoras de $IFN-\gamma^+$ e $IL-17^+$, que se encontravam em elevado número nos pulmões do grupo obeso.

Sabendo que a TB é uma doença crônica, cuja proteção é dependente da ativação da imunidade celular adaptativa mediada por células Th1 e Th17, e que estas células funcionam como alça de amplificação para o recrutamento de leucócitos da imunidade inata, como monócitos, células dendríticas e neutrófilos, nós consideramos que o aumento de células $CD4^+$ produtoras de $IFN-\gamma$ e/ou $IL-17$ estimularia maior influxo dos leucócitos da imunidade inata para os pulmões. Supreendentemente, não encontramos diferenças entre os grupos infectados, LFD/Mtb e HFD/Mtb, quando avaliamos as populações de células dendríticas e macrófagos, monócitos e neutrófilos. Apenas nos linfonodos do mediastino do grupo HFD/Mtb, encontramos aumento da população de cDC2 ($CD8\alpha^-CD11b^+$) produtora de $IL-6$, comparada ao grupo LFD/Mtb.

Embora nosso estudo seja direcionando à comorbidade obesidade e tuberculose, é válido ressaltar que a comorbidade diabetes e tuberculose compartilha a característica de intolerância à glicose com a obesidade, sendo a obesidade um dos fatores que predispõe ao desenvolvimento de diabetes tipo 2. Nesse contexto, vários estudos mostram que pacientes com diabetes, que são intolerantes à glicose, e com tuberculose exibem redução da ativação da resposta inata e exacerbação da resposta imune adaptativa (Kumar Nathella and Babu 2017). Kumar e colaboradores descreveram redução de monócitos circulantes nos pacientes com diabetes e tuberculose comparados aos pacientes com tuberculose, sem diabetes (Kumar, Moideen et al. 2015). Uma redução nas populações de células dendríticas de sangue periférico também foi descrita pelo mesmo grupo nos pacientes com a comorbidade comparados aos pacientes com tuberculose (Kumar, Moideen et al. 2015). Assim, é plausível sugerir que a comorbidade diabetes e tuberculose, além de afetar o número e função de leucócitos circulantes da imunidade inata, também pode afetar a capacidade de migração dessas células para o sítio inflamatório. Do contrário, os pacientes com diabetes e tuberculose exibem aumento de células $CD4^+IFN-\gamma^+$ e $CD4^+IL-17^+$, e células Treg (Kumar, Sridhar et al. 2013). O mesmo foi encontrado em nosso estudo experimental de comorbidade obesidade e tuberculose.

Como ambas, diabetes e obesidade cursam com intolerância à glicose, a hiperglicemia deve ser um fator importante na disfunção da resposta imunológica, tanto na redução da ativação da resposta inata como na exacerbação da ativação da resposta adaptativa. Porém, é importante destacar que a hiperglicemia não pode ser considerada fator preponderante, e outros fatores devem participar da alteração da resposta imunológica durante a ocorrência de disfunções metabólicas, pois após a conclusão do tratamento poliquimioterápico, os pacientes com tuberculose conseguem restabelecer o número de células dendríticas circulantes (Kumar, Moideen et al. 2016).

Em síntese, os resultados obtidos até o momento mostram que a obesidade induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica causa disfunção metabólica, associada com intolerância à glicose, e acentua a resposta inflamatória Th1 e Th17 nos pulmões dos animais infectados com *M. tuberculosis*, atribuindo-se a tal cenário inflamatório o aumento da suscetibilidade à infecção. Nesse contexto, procuramos um possível alvo para investigar o mecanismo responsável por aumentar a inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção. Para isso recorreremos novamente ao resultado de expressão gênica em larga escala, e baseando-se nas moléculas/receptores que participam da metainflamação decorrente da obesidade, selecionamos o receptor NLRP3.

NLRP3 é um inflamassoma caracterizado por uma plataforma proteica que ativa caspase-1, responsável pela clivagem das formas inativas das citocinas IL-1 β e IL-18, permitindo a síntese de formas ativas de ambas as moléculas (Lukens, Dixit et al. 2011, Rheinheimer, de Souza et al. 2017). Na TB, NLRP3 não parece desempenhar papel estrito na patologia da doença experimental (Dorhoi, Nouailles et al. 2012, Mishra, Rathinam et al. 2013, Lou, Wang et al. 2017). Porém, na obesidade, NLRP3 está associado à resistência à insulina e aumento da produção de IL-1 β decorrente da indução de obesidade (Stienstra, van Diepen et al. 2011).

Animais NLRP3^{-/-} alimentados com HFD e infectados com *M. tuberculosis* (NLRP3^{-/-} HFD/Mtb) exibiram maior massa corporal e significativo ganho de tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal comparados aos animais WT alimentados com HFD e infectados (WT HFD/Mtb). Ambos os grupos foram intolerantes à glicose. Estudos prévios mostraram que na ausência de NLRP3, ocorria redução dos parâmetros de obesidade, uma vez que animais NLRP3^{-/-} alimentados com HFD eram mais

resistentes ao desenvolvimento da obesidade (Stienstra, van Diepen et al. 2011, Vandanmagsar, Youm et al. 2011). No entanto, corroborando nossos achados, Kim e colaboradores mostraram que animais NLRP3^{-/-} alimentados com HFD tornaram-se obesos e foram mais sensíveis ao desenvolvimento de asma (Kim, Lee et al. 2014). Um estudo mais recente mostrou também o aumento do peso corporal e excesso de tecido adiposo nos animais NLRP3^{-/-} que receberam dieta ocidental. Em adição, esses animais foram intolerantes à glicose e resistentes à insulina (Ringling, Gastecki et al. 2016).

De modo inédito, nós mostramos que NLRP3 é um receptor chave que agrava a inflamação pulmonar e reduz a resistência à infecção por *M. tuberculosis* decorrente da metainflamação induzida pela obesidade, pois a recuperação de bacilos e a inflamação pulmonar do grupo NLRP3^{-/-} HFD/Mtb foram significativamente menores quando comparadas ao grupo WT HFD/Mtb. Além disso, a redução, embora não significativa, no número total de células CD4⁺IFN- γ ⁺ no grupo NLRP3^{-/-} HFD/Mtb, comparado ao grupo WT HFD/Mtb, também reforça que na ausência de NLRP3 há redução da resposta inflamatória Th1 resultante da obesidade. Para consolidar esses achados, experimentos com o uso de inibidores de NLRP3, IL-1 β e caspase-1 deverão ser conduzidos no futuro.

Diferente do que já foi descrito anteriormente, por Dorhoi e colaboradores e por Mishra e colaboradores, os animais NLRP3^{-/-} alimentados com dieta padrão (NLRP3^{-/-} LFD/Mtb) foram mais suscetíveis que os animais do grupo WT LFD/Mtb (Dorhoi, Nouailles et al. 2012, Mishra, Rathinam et al. 2013). Assim, esses resultados permitem que investiguemos melhor o papel de NLRP3 na infecção por *M. tuberculosis in vivo*.

Sabendo que a metainflamação induzida pela obesidade é dependente de NLRP3 e que a obesidade pode levar à disbiose (Ley, Turnbaugh et al. 2006, Zhang, DiBaise et al. 2009), avaliamos a microbiota na comorbidade obesidade e tuberculose. Em adição, produtos bacterianos derivados da dieta alimentar ou da microbiota podem estimular a liberação de IL-1 β pela ativação de NLRP3 (Dror, Dalmas et al. 2017). Nossa hipótese era de que a disbiose decorrente da obesidade afetaria a permeabilidade intestinal, o que resultaria em disbiose no microambiente pulmonar.

Poucos estudos avaliaram o papel da microbiota intestinal na TB. Winglee e colaboradores mostraram que animais infectados com *M. tuberculosis* tiveram alteração na microbiota intestinal, caracterizada por aumento do Filo Firmicutes e diminuição dos

Filos Bacteroidetes e Actinobacteria (Winglee, Eloie-Fadrosch et al. 2014). Além disso, animais tratados com antibióticos para eliminar a microbiota, após ser infectados por *M. tuberculosis*, apresentaram mudança da microbiota intestinal, que gerou aumento da susceptibilidade, aumento de células T reguladoras e diminuição de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ (Khan, Vidyarthi et al. 2016).

O aumento da expressão relativa do Filo Firmicutes e a diminuição do Filo Bacteroidetes no grupo HFD/Mtb quando comparado ao grupo LFD/Mtb confirmou nossa hipótese de que a obesidade gerou disbiose nos animais infectados com *M. tuberculosis*, e considerando os resultados do ensaio de UFC e a histopatologia, temos a associação entre disbiose, suscetibilidade e aumento da inflamação pulmonar. A obesidade por si já gerou disbiose, e foi acentuada de modo significativo na comorbidade, como mostra a comparação entre os grupos HFD versus HFD/Mtb.

Estudos em animais deficientes para leptina mostraram que a obesidade resultante da falta de produção de leptina causa disbiose, com aumento da razão de Firmicutes : Bacteroidetes quando comparados com animais magros (Ley, Bäckhed et al. 2005, Turnbaugh, Ley et al. 2006). Além disso, o consumo de HFD promoveu aumento de Firmicutes e Proteobacteria e diminuição de Bacteroidetes na composição da microbiota intestinal de camundongos (Hildebrandt, Hoffmann et al. 2009, Kim, Gu et al. 2012). O mesmo padrão de aumento de Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes foi observado em pessoas adultas e crianças obesas quando comparadas a pessoas ou crianças magras (Ley, Turnbaugh et al. 2006, Lecomte, Kaakoush et al. 2015).

A espécie *Bacteroides fragilis*, pertencente ao Filo Bacteroidetes, produz o polissacarídeo A (PSA), que tem efeito anti-inflamatório e é capaz de expandir células Treg Foxp3⁺ produtoras de IL-10 e inibir a produção de IL-17 (Mazmanian, Round et al. 2008). Espécies de *Clostridium*, pertencentes ao Filo Firmicutes, também promovem a diferenciação de células Treg Foxp3⁺ para manter a homeostase da mucosa intestinal (Atarashi, Tanoue et al. 2011, Atarashi, Tanoue et al. 2013). Esses estudos contribuem para confirmar nossos resultados, pois a redução de Bacteroidetes no grupo HFD/Mtb pode estar associada com menor capacidade de modular negativamente a inflamação. Além disso, também encontramos aumento de células CD4⁺Foxp3⁺ no grupo HFD/Mtb, que seria compatível com o aumento de Firmicutes encontrado nesses animais. No

entanto, o aumento das células Treg é acompanhado também por aumento de células $CD4^+IFN-\gamma^+$ e $CD4^+IL-17^+$. Além da disbiose associada aos Filos Bacteroidetes e Firmicutes, o aumento do Filo Proteobacteria no grupo HFD/Mtb comparado ao grupo HFD sugere aumento da resposta inflamatória no intestino (Shin, Whon et al. 2015). Em adição, a diminuição do Filo Actinobacteria no grupo HFD/Mtb comparado ao grupo HFD também sugere redução da resposta anti-inflamatória (Duca, Sakar et al. 2013). Dentro do Filo Actinobacteria, a espécie *Bifidobacterium* estimula a indução de resposta anti-inflamatória, de caráter tolerogênico (Binda, Lopetuso et al. 2018). Em relação ao Filo Proteobacteria, quando estão em menor proporção no intestino parecem ter um papel benéfico, mas durante uma disbiose, o aumento dessas bactérias poder acentuar uma resposta inflamatória nas doenças metabólicas e no câncer (Shin, Whon et al. 2015) .

Portanto, os dados da literatura reforçam os resultados obtidos no presente estudo, de que a obesidade está associada à disbiose intestinal pelo aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes, aumento do Filo Proteobacteria e redução de Actinobacteria nos animais HFD/Mtb, sugerindo a alteração da homeostase da resposta imune no intestino, e sugerindo também que a disbiose poderia estar associada com aumento da inflamação pulmonar dos animais obesos.

A partir das fibras presentes na dieta alimentar, as bactérias anaeróbicas da microbiota geram ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato (Puddu, Sanguineti et al. 2014, Schroeder and Bäckhed 2016). Os ácidos graxos de cadeia curta afetam processos celulares que incluem expressão de genes, diferenciação, proliferação, quimiotaxia e apoptose. Além disso, cooperam para a integridade do epitélio intestinal (Corrêa-Oliveira, Fachi et al. 2016) e participam na indução da inibição da histona deacetilase. Essa inibição tem impacto na redução da ativação de NF- κ B e promove a diferenciação de células Treg (Corrêa-Oliveira, Fachi et al. 2016). O acetato, produzido pela espécie *Bifidobacterium*, pertencente ao Filo Actinobacteria, protege contra infecções enteropatogênicas causadas pelas bactérias *Escherichia coli* e *Shigella* (Binda, Lopetuso et al. 2018). Entretanto, uma diminuição da espécie *Bifidobacterium* devido à dieta (HFD) está associada ao aumento da permeabilidade intestinal, que leva à translocação de LPS e ativação da sinalização de TLR4 (Duca, Sakar et al. 2013). Dessa forma, a disbiose decorrente da obesidade

também é caracterizada por aumento de LPS e alteração da permeabilidade intestinal, que induzem translocação bacteriana para outros órgãos periféricos (Belkaid and Hand 2014, Schroeder and Bäckhed 2016).

Além da disbiose, nós verificamos redução de acetato e propionato e aumento de butirato nas fezes de animais do grupo HFD/Mtb comparado ao grupo LFD/Mtb, o que sugere que, a microbiota e os metabólitos, como os AGCC, participam da modulação da inflamação pulmonar na comorbidade obesidade e tuberculose.

O butirato serve como fonte de energia para as células epiteliais, e sua ausência pode causar modificações no epitélio intestinal, permitindo o aumento da permeabilidade intestinal. O butirato é, geralmente, produzido pelas bactérias do gênero *Clostridium spp*, pertencentes ao Filo Firmicutes. O butirato interage com seu receptor GPR109 nas células intestinais, macrófagos e células dendríticas, induzindo a proliferação de células Treg (Peng, Li et al. 2009, Arpaia, Campbell et al. 2013, Furusawa, Obata et al. 2013, Singh, Gurav et al. 2014).

No entanto, um estudo recente mostrou que os AGCC, especialmente butirato, em concentrações elevadas, induziu a polarização de células Th1 produtoras de IFN- γ e também células Treg *in vitro*. Entretanto, baixas concentrações de butirato induziram a diferenciação de células Treg Foxp3⁺. O mesmo estudo reportou que em modelo de colite, animais *germ free* tratados com butirato apresentaram aumento da expressão de genes pró-inflamatórios (T-bet e IFN- γ) nas células de colón (Kespohl, Vachharajani et al. 2017). Por outro lado, propionato e acetato também são produzidos pelas bactérias que pertencem ao Filo Bacteroidetes (Lu, Fan et al. 2016). O propionato também ativa as células Treg e também participa no aumento da hematopoese de DCs com pouca capacidade de induzir células Th2 efectoras, resultando na proteção do desenvolvimento de asma alérgica em camundongos (Trompette, Gollwitzer et al. 2014). Em conjunto, esses estudos sugerem que os AGCC tem um efeito pleiotrópico que depende de sua concentração e do microambiente da resposta imune.

Considerando os achados deste trabalho e os dados dos estudos descritos, podemos inferir que o aumento de butirato foi devido ao aumento da sua produção por bactérias do Filo Firmicutes, detectado nas fezes dos animais HFD/Mtb, sugerindo que o butirato poderia estar associado com o aumento de células Treg, e ainda, com a

proliferação de células Th1 encontradas no pulmão dos animais HFD/Mtb. No entanto, a diminuição de acetato e propionato correlacionam-se com a diminuição de bactérias do Filo Bacteroidetes, cuja expressão gênica foi maior no íleo dos animais do grupo LFD/Mtb. Assim, a diminuição de Bacteroidetes, acetato e propionato no grupo HFD/Mtb poderiam acentuar a inflamação pulmonar. Além disso, presumivelmente, a baixa quantidade de carboidratos presentes na dieta hiperlipídica (HFD), colaborou para a redução na porcentagem de acetato e propionato.

Dessa forma, os AGCC representam, atualmente, uma estratégia promissora para modular respostas inflamatórias. O tratamento com AGCC exógenos incluídos na dieta foi eficiente na proteção contra o desenvolvimento de diabetes do tipo 1 (Mariño, Richards et al. 2017). Um único estudo em doença respiratória experimental mostrou que AGCC produzidos no intestino restringiram a polarização de células Th2, resultando em proteção contra o desenvolvimento da asma alérgica (Trompette, Gollwitzer et al. 2014). Além disso, Asarat e colaboradores mostraram que os AGCC, particularmente o butirato, induziu maior diferenciação de células Treg do que células Th17 a partir de células mononucleares de sangue periférico (Asarat, Apostolopoulos et al. 2016).

Como citado anteriormente, a dieta hiperlipídica (HFD) diminui a prevalência de bactérias que protegem a barreira intestinal, aumentando a densidade de bactérias gram-negativas, que liberam LPS (Reilly and Saltiel 2017). A disbiose facilita a permeabilidade da barreira intestinal, permitindo que o LPS entre na circulação e cause endotoxemia. Isso acentua a metainflamação, colabora para a indução de resistência à insulina e hiperplasia dos adipócitos (Shi, Kokoeva et al. 2006, Cani, Bibiloni et al. 2008). Além do LPS, os AGCC ou mesmo as bactérias podem ser translocados para outros tecidos, como pulmões, através do aumento da permeabilidade da membrana intestinal. Nesse contexto, foi avaliada a expressão das proteínas de junções firmes (*TJ-tight junction*), que participam na integridade da barreira intestinal (Zihni, Mills et al. 2016, Wang, Mumm et al. 2017). O aumento de claudina-2, uma proteína transmembrana que está expressa nas cristas intestinais e no epitélio da mucosa do intestino delgado e grosso, no grupo HFD/Mtb é um indicativo indireto de aumento de translocação bacteriana porque o aumento de sua expressão está relacionado com incremento na permeabilidade da barreira intestinal (Zihni, Mills et al. 2016, Wang, Mumm et al. 2017). Além disso, a

expressão de claudina-2 nas células epiteliais é um marcador de doenças inflamatórias crônicas, como doença de Crohn, colite, infecção por HIV e doença celíaca (Randall, Henderson et al. 2016, Wang, Mumm et al. 2017). Outro fator que altera a permeabilidade da barreira intestinal é o aumento da glicemia, como descrito no estudo realizado por Thaïss e colaboradores (Thaïss, Levy et al. 2018). Assim, a hiperglicemia encontrada nos animais do grupo HFD/Mtb, juntamente com a disbiose e a alteração na porcentagem de AGCC, pode ser mais um fator associado com aumento da permeabilidade intestinal.

A alteração na integridade da barreira intestinal pode permitir translocação de bactérias ou de metabólitos produzidos pela microbiota que podem agir no pulmão e modular na resposta imunológica pulmonar, como já descrito anteriormente na asma alérgica (Trompette, Gollwitzer et al. 2014, Huffnagle, Dickson et al. 2017).

Ainda são poucos os estudos que associam a relação intestino/pulmões e o mecanismo imunológico entre eles. Mas, é sabido que o pulmão não é um órgão estéril, sendo a microbiota pulmonar constituída por 10 a 100 espécies de bactérias para cada 1000 células humanas, com predominância dos Filos Bacteroidetes e Firmicutes, e menor prevalência dos Filos Proteobacteria e Actinobacteria (Marsland and Gollwitzer 2014). A composição bacteriana no pulmão pode ser alterada pelo uso de antibióticos, fatores ambientais e, principalmente, pelas infecções respiratórias, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), asma, infecções virais, causadas por vírus da influenza, e bacterianas, causadas por *M. tuberculosis* (Ichinohe, Pang et al. 2011, Hong, Maulén et al. 2016, Huffnagle, Dickson et al. 2017). Estudos mostraram que o tratamento para TB pode alterar a microbiota pulmonar e afetar o tratamento da doença (Hong, Maulén et al. 2016). Um estudo clínico realizado a partir de amostras de escarro revelou que pacientes com TB apresentaram alteração na microbiota pulmonar, acompanhada de aumento dos Filos Firmicutes e Actinobacteria (Krishna, Jain et al. 2016).

Nesse sentido, com a finalidade de associar o eixo microbiota intestinal/pulmonar, determinamos a microbiota pulmonar na comorbidade obesidade e tuberculose, e encontramos aumento da expressão relativa dos Filos Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria, e redução de Proteobacteria nos pulmões do grupo HFD/Mtb quando comparado aos animais LFD/Mtb.

Esses resultados foram parcialmente similares aos observados na microbiota intestinal dos animais HFD/Mtb, e revelam a disbiose, tanto intestinal quanto pulmonar.

Os resultados sugerem que a inflamação decorrente da comorbidade obesidade e tuberculose altera a microbiota e o microambiente pulmonar. Diante disso, sugerimos que a disbiose pulmonar pode ser decorrente de translocação bacteriana do intestino para os pulmões (Samuelson et al., 2015), e que as bactérias da microbiota bem como a alteração na porcentagem de seus metabólitos, os AGCC, intensificam a inflamação pulmonar mediada por células Th1 e Th17, contribuindo para aumentar a colonização por micobactérias, e acentuando a suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis*.

Para confirmar essa hipótese, outros ensaios para avaliar a permeabilidade e translocação bacteriana serão feitos para consolidar esses dados. O próximo passo será realizar um estudo de transplante fecal que nos facilitaria compreender se a microbiota intestinal influencia a resposta inflamatória pulmonar. Em seguida, será realizada a identificação dos gêneros ou espécies de bactérias produtoras de butirato. Além disso, será avaliada a associação de NLRP3 com a microbiota intestinal, pois, como descrito anteriormente, NLRP3 participa da inflamação pulmonar na infecção por *M. tuberculosis* (Lou, Wang et al. 2017) e na metainflação induzida pela obesidade (Kamada, Seo et al. 2013), podendo também ser ativado pela microbiota, estimulando a produção de IL-1 β (Kamada, Seo et al. 2013, Seo, Kamada et al. 2015).

Esse seria um indício de que o eixo microbiota intestinal/pulmonar afeta positivamente a resposta inflamatória nos pulmões, decorrente da obesidade induzida por dieta, acentuando a suscetibilidade à tuberculose.

Figura 24. Ilustração representativa dos eventos que acontecem na comorbidade obesidade e tuberculose. Camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) ganharam peso, gordura e aumentaram os níveis de IL-1β no tecido adiposo. Além disso, foram hiperglicêmicos e aumentaram os níveis de IFN-γ séricos. Após infecção com *M. tuberculosis* (Mtb) foram menos resistentes na infecção com maior UFC e inflamação pulmonar. No pulmão foi observado aumento da expressão gênica de NLRP3 e células CD4⁺ produtoras de IFN-γ⁺ e/ou IL-17⁺, CD8⁺ e TregFoxp3⁺. A disbiose causada pela obesidade foi caracterizada pelo aumento de Firmicutes e redução dos Filos Bacteroidetes e Proteobacteria, além do aumento de butirato. O aumento de claudina-2 sugere alteração na permeabilidade intestinal e possível translocação bacteriana ao pulmão, caracterizada pelo aumento de Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria e redução de Proteobacteria. Além disso o aumento de butirato poderia contribuir para intensificar a inflamação pulmonar.

6. SÍNTESE DOS RESULTADOS

- Animais alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) têm aumento de peso corporal e de peso dos tecidos adiposos, são intolerantes à glicose, deficientes na produção de insulina, expressam mais IL-1 β no tecido adiposo e níveis séricos de IFN- γ comparados aos animais alimentados com dieta padrão (LFD);
- Animais obesos apresentam maior inflamação pulmonar e são mais suscetíveis à infecção com *M. tuberculosis* quando comparados aos animais magros;
- Animais obesos e infectados com *M. tuberculosis* exibem maior expressão de genes associados com a metainflamação e com a resposta inflamatória Th1 e Th17 nos pulmões comparados aos animais alimentados magros e infectados;
- Há exacerbação da resposta adaptativa, caracterizada por elevado número de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17, células CD8⁺ e células Treg nos pulmões de animais alimentados HFD e infectados com *M. tuberculosis* quando comparados aos animais alimentados com LFD e infectados;
- Animais deficientes para a expressão de NLRP3 alimentados com HFD são menos suscetíveis e apresentam redução da inflamação pulmonar comparados aos animais WT alimentados com HFD e infectados;
- Animais alimentados com HFD e infectados com *M. tuberculosis* apresentam disbiose, caracterizada por aumento de Firmicutes e de Proteobacteria, acompanhada de aumento de butirato, e diminuição de Bacteroidetes e de Actinobacteria, acompanhada de redução de propionato e de acetato no intestino comparados aos animais alimentados com LFD e infectados;
- Animais alimentados com dieta HFD e infectados com *M. tuberculosis* apresentam aumento da expressão de claudina-2 no intestino, sugerindo aumento da permeabilidade na barreira intestinal, e aumento da expressão relativa dos Filos Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria, e redução de Proteobacteria nos pulmões comparados aos animais alimentados com LFD e infectados, sugerindo translocação bacteriana decorrente da permeabilidade intestinal.

7. CONCLUSÃO

A obesidade aumenta a magnitude da inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis* por um mecanismo dependente de NLRP3. Ambos, aumento da suscetibilidade à infecção e da inflamação pulmonar estão associadas com disbiose intestinal e pulmonar, e aumento da permeabilidade da barreira intestinal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmad, R., B. Rah, D. Bastola, P. Dhawan and A. B. Singh (2017). "Obesity-induces Organ and Tissue Specific Tight Junction Restructuring and Barrier Deregulation by Claudin Switching." *Sci Rep* **7**(1): 5125.
2. Ang, Z. and J. L. Ding (2016). "GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative?" *Front Immunol* **7**: 28.
3. Arpaia, N., C. Campbell, X. Fan, S. Dikiy, J. van der Veeken, P. deRoos, H. Liu, J. R. Cross, K. Pfeffer, P. J. Coffey and A. Y. Rudensky (2013). "Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation." *Nature* **504**(7480): 451-455.
4. Asarat, M., V. Apostolopoulos, T. Vasiljevic and O. Donkor (2016). "Short-Chain Fatty Acids Regulate Cytokines and Th17/Treg Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro." *Immunol Invest* **45**(3): 205-222.
5. Atarashi, K., T. Tanoue, K. Oshima, W. Suda, Y. Nagano, H. Nishikawa, S. Fukuda, T. Saito, S. Narushima, K. Hase, S. Kim, J. V. Fritz, P. Wilmes, S. Ueha, K. Matsushima, H. Ohno, B. Olle, S. Sakaguchi, T. Taniguchi, H. Morita, M. Hattori and K. Honda (2013). "Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota." *Nature* **500**(7461): 232-236.
6. Atarashi, K., T. Tanoue, T. Shima, A. Imaoka, T. Kuwahara, Y. Momose, G. Cheng, S. Yamasaki, T. Saito, Y. Ohba, T. Taniguchi, K. Takeda, S. Hori, I. I. Ivanov, Y. Umesaki, K. Itoh and K. Honda (2011). "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species." *Science* **331**(6015): 337-341.
7. Bafica, A., C. A. Scanga, C. G. Feng, C. Leifer, A. Cheever and A. Sher (2005). "TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis." *J Exp Med* **202**(12): 1715-1724.
8. Belkaid, Y. and T. W. Hand (2014). "Role of the microbiota in immunity and inflammation." *Cell* **157**(1): 121-141.
9. Binda, C., L. R. Lopetuso, G. Rizzatti, G. Gibiino, V. Cennamo and A. Gasbarrini (2018). "Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis." *Dig Liver Dis* **50**(5): 421-428.
10. Bing, C. (2015). "Is interleukin-1 β a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity?" *Adipocyte* **4**(2): 149-152.
11. Bochicchio, G. V., M. Joshi, K. Bochicchio, S. Nehman, J. K. Tracy and T. M. Scalea (2006). "Impact of obesity in the critically ill trauma patient: a prospective study." *J Am Coll Surg* **203**(4): 533-538.
12. Borre, Y. E., G. W. O'Keeffe, G. Clarke, C. Stanton, T. G. Dinan and J. F. Cryan (2014). "Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders." *Trends Mol Med* **20**(9): 509-518.
13. Brasil, M. d. S.-G. d. (2017). Boletim Epidemiológico-Secretaria de Vigilância em Saúde.
14. Brasil, P. d. S.-. (2017). Obesidade.
15. Briken, V., S. E. Ahlbrand and S. Shah (2013). "Mycobacterium tuberculosis and the host cell inflammasome: a complex relationship." *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 62.

16. Bäckhed, F., R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson and J. I. Gordon (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." *Science* **307**(5717): 1915-1920.
17. Cadena, A. M., S. M. Fortune and J. L. Flynn (2017). "Heterogeneity in tuberculosis." *Nat Rev Immunol* **17**(11): 691-702.
18. Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmée, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrières, J. F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi and R. Burcelin (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* **56**(7): 1761-1772.
19. Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne and R. Burcelin (2008). "Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice." *Diabetes* **57**(6): 1470-1481.
20. Caër, C., C. Rouault, T. Le Roy, C. Poitou, J. Aron-Wisnewsky, A. Torcivia, J. C. Bichet, K. Clément, M. Guerre-Millo and S. André (2017). "Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, fibrogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue." *Sci Rep* **7**(1): 3000.
21. CDC (2016). Tuberculosis (TB).
22. Chabé, M., A. Lokmer and L. Ségurel (2017). "Gut Protozoa: Friends or Foes of the Human Gut Microbiota?" *Trends Parasitol* **33**(12): 925-934.
23. Chen, X., B. Zhou, M. Li, Q. Deng, X. Wu, X. Le, C. Wu, N. Larmonier, W. Zhang, H. Zhang, H. Wang and E. Katsanis (2007). "CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease." *Clin Immunol* **123**(1): 50-59.
24. Chen, Y. C., C. H. Chin, S. F. Liu, C. C. Wu, C. C. Tsen, Y. H. Wang, T. Y. Chao, C. H. Lie, C. J. Chen, C. C. Wang and M. C. Lin (2011). "Prognostic values of serum IP-10 and IL-17 in patients with pulmonary tuberculosis." *Dis Markers* **31**(2): 101-110.
25. Clemente, J. C., L. K. Ursell, L. W. Parfrey and R. Knight (2012). "The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view." *Cell* **148**(6): 1258-1270.
26. Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell and I. M. Orme (1993). "Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice." *J Exp Med* **178**(6): 2243-2247.
27. Cooper, A. M., J. Magram, J. Ferrante and I. M. Orme (1997). "Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis." *J Exp Med* **186**(1): 39-45.
28. Cooper, A. M., K. D. Mayer-Barber and A. Sher (2011). "Role of innate cytokines in mycobacterial infection." *Mucosal Immunol* **4**(3): 252-260.
29. Corrêa-Oliveira, R., J. L. Fachi, A. Vieira, F. T. Sato and M. A. Vinolo (2016). "Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids." *Clin Transl Immunology* **5**(4): e73.
30. da Fonseca, D. M., C. L. Silva, P. F. Wowk, M. O. Paula, S. G. Ramos, C. Horn, G. Marchal and V. L. Bonato (2009). "Mycobacterium tuberculosis culture filtrate

- proteins plus CpG Oligodeoxynucleotides confer protection to *Mycobacterium bovis* BCG-primed mice by inhibiting interleukin-4 secretion." *Infect Immun* **77**(12): 5311-5321.
31. Dalby, M. J., A. W. Ross, A. W. Walker and P. J. Morgan (2017). "Dietary Uncoupling of Gut Microbiota and Energy Harvesting from Obesity and Glucose Tolerance in Mice." *Cell Rep* **21**(6): 1521-1533.
 32. Deiluiis, J., Z. Shah, N. Shah, B. Needleman, D. Mikami, V. Narula, K. Perry, J. Hazey, T. Kampfrath, M. Kollengode, Q. Sun, A. R. Satoskar, C. Lumeng, S. Moffatt-Bruce and S. Rajagopalan (2011). "Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in tregulatory cell numbers." *PLoS One* **6**(1): e16376.
 33. Desai, M. S., A. M. Seekatz, N. M. Koropatkin, N. Kamada, C. A. Hickey, M. Wolter, N. A. Pudlo, S. Kitamoto, N. Terrapon, A. Muller, V. B. Young, B. Henrissat, P. Wilmes, T. S. Stappenbeck, G. Núñez and E. C. Martens (2016). "A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility." *Cell* **167**(5): 1339-1353.e1321.
 34. Dheda, K., C. E. Barry and G. Maartens (2016). "Tuberculosis." *Lancet* **387**(10024): 1211-1226.
 35. Dooley, K. E. and R. E. Chaisson (2009). "Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics." *Lancet Infect Dis* **9**(12): 737-746.
 36. Dorhoi, A., G. Nouailles, S. Jorg, K. Hagens, E. Heinemann, L. Pradl, D. Oberbeck-Muller, M. A. Duque-Correa, S. T. Reece, J. Ruland, R. Brosch, J. Tschopp, O. Gross and S. H. Kaufmann (2012). "Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis." *Eur J Immunol* **42**(2): 374-384.
 37. Dorhoi, A., G. Nouailles, S. Jörg, K. Hagens, E. Heinemann, L. Pradl, D. Oberbeck-Müller, M. A. Duque-Correa, S. T. Reece, J. Ruland, R. Brosch, J. Tschopp, O. Gross and S. H. Kaufmann (2012). "Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis." *Eur J Immunol* **42**(2): 374-384.
 38. Dror, E., E. Dalmas, D. T. Meier, S. Wueest, J. Thévenet, C. Thienel, K. Timper, T. M. Nordmann, S. Traub, F. Schulze, F. Item, D. Vallois, F. Pattou, J. Kerr-Conte, V. Lavallard, T. Berney, B. Thorens, D. Konrad, M. Böni-Schnetzler and M. Y. Donath (2017). "Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation." *Nat Immunol* **18**(3): 283-292.
 39. Duca, F. A., Y. Sakar and M. Covasa (2013). "The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity." *J Nutr Biochem* **24**(10): 1663-1677.
 40. Easterbrook, J. D., R. L. Dunfee, L. M. Schwartzman, B. W. Jagger, A. Sandouk, J. C. Kash, M. J. Memoli and J. K. Taubenberger (2011). "Obese mice have increased morbidity and mortality compared to non-obese mice during infection with the 2009 pandemic H1N1 influenza virus." *Influenza Other Respir Viruses* **5**(6): 418-425.

41. Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson and D. A. Relman (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." *Science* **308**(5728): 1635-1638.
42. El Kasmi, K. C., J. E. Qualls, J. T. Pesce, A. M. Smith, R. W. Thompson, M. Henao-Tamayo, R. J. Basaraba, T. König, U. Schleicher, M. S. Koo, G. Kaplan, K. A. Fitzgerald, E. I. Tuomanen, I. M. Orme, T. D. Kanneganti, C. Bogdan, T. A. Wynn and P. J. Murray (2008). "Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens." *Nat Immunol* **9**(12): 1399-1406.
43. Falagas, M. E. and M. Kompoti (2006). "Obesity and infection." *Lancet Infect Dis* **6**(7): 438-446.
44. Feuerer, M., L. Herrero, D. Cipolletta, A. Naaz, J. Wong, A. Nayer, J. Lee, A. B. Goldfine, C. Benoist, S. Shoelson and D. Mathis (2009). "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters." *Nat Med* **15**(8): 930-939.
45. Finucane, O. M., C. L. Lyons, A. M. Murphy, C. M. Reynolds, R. Klinger, N. P. Healy, A. A. Cooke, R. C. Coll, L. McAllan, K. N. Nilaweera, M. E. O'Reilly, A. C. Tierney, M. J. Morine, J. F. Alcalá-Díaz, J. López-Miranda, D. P. O'Connor, L. A. O'Neill, F. C. McGillicuddy and H. M. Roche (2015). "Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity." *Diabetes* **64**(6): 2116-2128.
46. Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart and B. R. Bloom (1993). "An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection." *J Exp Med* **178**(6): 2249-2254.
47. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak and B. R. Bloom (1995). "Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice." *Immunity* **2**(6): 561-572.
48. Franchi, L., R. Muñoz-Planillo, T. Reimer, T. Eigenbrod and G. Núñez (2010). "Inflammasomes as microbial sensors." *Eur J Immunol* **40**(3): 611-615.
49. Fujisaka, S., I. Usui, A. Bukhari, M. Ikutani, T. Oya, Y. Kanatani, K. Tsuneyama, Y. Nagai, K. Takatsu, M. Urakaze, M. Kobayashi and K. Tobe (2009). "Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice." *Diabetes* **58**(11): 2574-2582.
50. Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase and H. Ohno (2013). "Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells." *Nature* **504**(7480): 446-450.
51. Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett and K. E. Nelson (2006). "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome." *Science* **312**(5778): 1355-1359.

52. González-Muniesa, P., M. A. Martínez-González, F. B. Hu, J. P. Després, Y. Matsuzawa, R. J. F. Loos, L. A. Moreno, G. A. Bray and J. A. Martinez (2017). "Obesity." Nat Rev Dis Primers **3**: 17034.
53. Guyot-Revol, V., J. A. Innes, S. Hackforth, T. Hinks and A. Lalvani (2006). "Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **173**(7): 803-810.
54. Hanrahan, C. F., J. E. Golub, L. Mohapi, N. Tshabangu, T. Modisenyane, R. E. Chaisson, G. E. Gray, J. A. McIntyre and N. A. Martinson (2010). "Body mass index and risk of tuberculosis and death." AIDS **24**(10): 1501-1508.
55. Hernandez-Pando, R., H. Orozco and D. Aguilar (2009). "Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **57**(5): 355-367.
56. Hildebrandt, M. A., C. Hoffmann, S. A. Sherrill-Mix, S. A. Keilbaugh, M. Hamady, Y. Y. Chen, R. Knight, R. S. Ahima, F. Bushman and G. D. Wu (2009). "High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity." Gastroenterology **137**(5): 1716-1724.e1711-1712.
57. Hong, B. Y., N. P. Maulén, A. J. Adami, H. Granados, M. E. Balcells and J. Cervantes (2016). "Microbiome Changes during Tuberculosis and Antituberculous Therapy." Clin Microbiol Rev **29**(4): 915-926.
58. Hsu, A., D. M. Aronoff, J. Phipps, D. Goel and P. Mancuso (2007). "Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia." Clin Exp Immunol **150**(2): 332-339.
59. Huang, Z., Q. Luo, Y. Guo, J. Chen, G. Xiong, Y. Peng, J. Ye and J. Li (2015). "Mycobacterium tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro." PLoS One **10**(6): e0129744.
60. Huffnagle, G. B., R. P. Dickson and N. W. Lukacs (2017). "The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street." Mucosal Immunol **10**(2): 299-306.
61. Ichinohe, T., I. K. Pang, Y. Kumamoto, D. R. Peaper, J. H. Ho, T. S. Murray and A. Iwasaki (2011). "Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(13): 5354-5359.
62. Inouye, K. E., H. Shi, J. K. Howard, C. H. Daly, G. M. Lord, B. J. Rollins and J. S. Flier (2007). "Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue." Diabetes **56**(9): 2242-2250.
63. Jager, J., T. Grémeaux, M. Cormont, Y. Le Marchand-Brustel and J. F. Tanti (2007). "Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression." Endocrinology **148**(1): 241-251.
64. Jernberg, C., S. Löfmark, C. Edlund and J. K. Jansson (2010). "Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota." Microbiology **156**(Pt 11): 3216-3223.
65. Jia, W., H. Li, L. Zhao and J. K. Nicholson (2008). "Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting." Nat Rev Drug Discov **7**(2): 123-129.

66. Jurado, J. O., V. Pasquinelli, I. B. Alvarez, D. Peña, A. I. Rovetta, N. L. Tateosian, H. E. Romeo, R. M. Musella, D. Palmero, H. E. Chuluyán and V. E. García (2012). "IL-17 and IFN- γ expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease." J Leukoc Biol **91**(6): 991-1002.
67. Kahnert, A., P. Seiler, M. Stein, S. Bandermann, K. Hahnke, H. Mollenkopf and S. H. Kaufmann (2006). "Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to Mycobacterium tuberculosis." Eur J Immunol **36**(3): 631-647.
68. Kamada, N., S. U. Seo, G. Y. Chen and G. Núñez (2013). "Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease." Nat Rev Immunol **13**(5): 321-335.
69. Kanneganti, T. D. and V. D. Dixit (2012). "Immunological complications of obesity." Nat Immunol **13**(8): 707-712.
70. Karlsson, E. A., P. A. Sheridan and M. A. Beck (2010). "Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection." J Immunol **184**(6): 3127-3133.
71. Kespohl, M., N. Vachharajani, M. Luu, H. Harb, S. Pautz, S. Wolff, N. Sillner, A. Walker, P. Schmitt-Kopplin, T. Boettger, H. Renz, S. Offermanns, U. Steinhoff and A. Visekruna (2017). "The Microbial Metabolite Butyrate Induces Expression of Th1-Associated Factors in CD4." Front Immunol **8**: 1036.
72. Khader, S. A. and A. M. Cooper (2008). "IL-23 and IL-17 in tuberculosis." Cytokine **41**(2): 79-83.
73. Khan, N., A. Vidyarthi, S. Nadeem, S. Negi, G. Nair and J. N. Agrewala (2016). "Alteration in the Gut Microbiota Provokes Susceptibility to Tuberculosis." Front Immunol **7**: 529.
74. Kim, H. Y., H. J. Lee, Y. J. Chang, M. Pichavant, S. A. Shore, K. A. Fitzgerald, Y. Iwakura, E. Israel, K. Bolger, J. Faul, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2014). "Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity." Nat Med **20**(1): 54-61.
75. Kim, J. J. and D. D. Sears (2010). "TLR4 and Insulin Resistance." Gastroenterol Res Pract **2010**.
76. Kim, K. A., W. Gu, I. A. Lee, E. H. Joh and D. H. Kim (2012). "High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway." PLoS One **7**(10): e47713.
77. Kimura, I., K. Ozawa, D. Inoue, T. Imamura, K. Kimura, T. Maeda, K. Terasawa, D. Kashiwara, K. Hirano, T. Tani, T. Takahashi, S. Miyauchi, G. Shioi, H. Inoue and G. Tsujimoto (2013). "The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43." Nat Commun **4**: 1829.
78. Koch, R. (1982). "Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882." Rev Infect Dis **4**(6): 1270-1274.
79. Krishna, P., A. Jain and P. S. Bisen (2016). "Microbiome diversity in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **35**(7): 1205-1210.

80. Kumar Nathella, P. and S. Babu (2017). "Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis." *Immunology* **152**(1): 13-24.
81. Kumar, N. P., K. Moideen, S. D. Dhakshinraj, V. V. Banurekha, D. Nair, C. Dolla, P. Kumaran and S. Babu (2015). "Profiling leucocyte subsets in tuberculosis-diabetes co-morbidity." *Immunology* **146**(2): 243-250.
82. Kumar, N. P., K. Moideen, V. Viswanathan, H. Kornfeld and S. Babu (2016). "Effect of standard tuberculosis treatment on naive, memory and regulatory T-cell homeostasis in tuberculosis-diabetes co-morbidity." *Immunology* **149**(1): 87-97.
83. Kumar, N. P., R. Sridhar, V. V. Banurekha, M. S. Jawahar, T. B. Nutman and S. Babu (2013). "Expansion of pathogen-specific T-helper 1 and T-helper 17 cells in pulmonary tuberculosis with coincident type 2 diabetes mellitus." *J Infect Dis* **208**(5): 739-748.
84. Kumar, P. (2017). "IFN γ -producing CD4." *Clin Transl Med* **6**(1): 21.
85. Kursawe, R., V. D. Dixit, P. E. Scherer, N. Santoro, D. Narayan, R. Gordillo, C. Giannini, X. Lopez, B. Pierpont, J. Nouws, G. I. Shulman and S. Caprio (2016). "A Role of the Inflammasome in the Low Storage Capacity of the Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue in Obese Adolescents." *Diabetes* **65**(3): 610-618.
86. Kusminski, C. M., P. E. Bickel and P. E. Scherer (2016). "Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes." *Nat Rev Drug Discov* **15**(9): 639-660.
87. Kwok, K. H., K. S. Lam and A. Xu (2016). "Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications." *Exp Mol Med* **48**: e215.
88. Lachmandas, E., F. Vrieling, L. G. Wilson, S. A. Joosten, M. G. Netea, T. H. Ottenhoff and R. van Crevel (2015). "The effect of hyperglycaemia on in vitro cytokine production and macrophage infection with Mycobacterium tuberculosis." *PLoS One* **10**(2): e0117941.
89. Lai, R., M. Jeyanathan, S. Afkhami, A. Zganiacz, J. A. Hammill, Y. Yao, C. Kaushic and Z. Xing (2018). "CD11b." *J Immunol* **200**(5): 1746-1760.
90. Larsson, S. C. and A. Wolk (2007). "Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies." *Am J Clin Nutr* **86**(3): 556-565.
91. Latz, E., T. S. Xiao and A. Stutz (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." *Nat Rev Immunol* **13**(6): 397-411.
92. Lecomte, V., N. O. Kaakoush, C. A. Maloney, M. Raipuria, K. D. Huinao, H. M. Mitchell and M. J. Morris (2015). "Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters." *PLoS One* **10**(5): e0126931.
93. Lee, N. and W. U. Kim (2017). "Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases." *Exp Mol Med* **49**(5): e340.
94. Leung, C. C., T. H. Lam, W. M. Chan, W. W. Yew, K. S. Ho, G. Leung, W. S. Law, C. M. Tam, C. K. Chan and K. C. Chang (2007). "Lower risk of tuberculosis in obesity." *Arch Intern Med* **167**(12): 1297-1304.
95. Ley, R. E., F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight and J. I. Gordon (2005). "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 11070-11075.
96. Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, S. Klein and J. I. Gordon (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." *Nature* **444**(7122): 1022-1023.

97. Lin, H. V., A. Frassetto, E. J. Kowalik, A. R. Nawrocki, M. M. Lu, J. R. Kosinski, J. A. Hubert, D. Szeto, X. Yao, G. Forrest and D. J. Marsh (2012). "Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms." *PLoS One* **7**(4): e35240.
98. Lou, J., Y. Wang, Z. Zhang and W. Qiu (2017). "MiR-20b inhibits mycobacterium tuberculosis induced inflammation in the lung of mice through targeting NLRP3." *Exp Cell Res* **358**(2): 120-128.
99. Lu, Y., C. Fan, P. Li, X. Chang and K. Qi (2016). "Short Chain Fatty Acids Prevent High-fat-diet-induced Obesity in Mice by Regulating G Protein-coupled Receptors and Gut Microbiota." *Sci Rep* **6**: 37589.
100. Lukens, J. R., V. D. Dixit and T. D. Kanneganti (2011). "Inflammasome activation in obesity-related inflammatory diseases and autoimmunity." *Discov Med* **12**(62): 65-74.
101. Lumeng, C. N. (2013). "Innate immune activation in obesity." *Mol Aspects Med* **34**(1): 12-29.
102. Lumeng, C. N., J. L. Bodzin and A. R. Saltiel (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." *J Clin Invest* **117**(1): 175-184.
103. Lumeng, C. N. and A. R. Saltiel (2011). "Inflammatory links between obesity and metabolic disease." *J Clin Invest* **121**(6): 2111-2117.
104. Lyadova, I. V. and A. V. Panteleev (2015). "Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers." *Mediators Inflamm* **2015**: 854507.
105. Lönnroth, K., B. G. Williams, P. Cegielski and C. Dye (2010). "A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index." *Int J Epidemiol* **39**(1): 149-155.
106. Macri, C., E. S. Pang, T. Patton and M. O'Keeffe (2017). "Dendritic cell subsets." *Semin Cell Dev Biol*.
107. Mancuso, P. (2010). "Obesity and lung inflammation." *J Appl Physiol* (1985) **108**(3): 722-728.
108. Mancuso, P. (2013). "Obesity and respiratory infections: does excess adiposity weigh down host defense?" *Pulm Pharmacol Ther* **26**(4): 412-419.
109. Mancuso, P., A. Gottschalk, S. M. Phare, M. Peters-Golden, N. W. Lukacs and G. B. Huffnagle (2002). "Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia." *J Immunol* **168**(8): 4018-4024.
110. Mariño, E., J. L. Richards, K. H. McLeod, D. Stanley, Y. A. Yap, J. Knight, C. McKenzie, J. Kranich, A. C. Oliveira, F. J. Rossello, B. Krishnamurthy, C. M. Nefzger, L. Macia, A. Thorburn, A. G. Baxter, G. Morahan, L. H. Wong, J. M. Polo, R. J. Moore, T. J. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, L. C. Harrison and C. R. Mackay (2017). "Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes." *Nat Immunol* **18**(5): 552-562.
111. Marsland, B. J. and E. S. Gollwitzer (2014). "Host-microorganism interactions in lung diseases." *Nat Rev Immunol* **14**(12): 827-835.

112. Martinez, F. O., L. Helming and S. Gordon (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." Annu Rev Immunol **27**: 451-483.
113. Mathis, D. and S. E. Shoelson (2011). "Immunometabolism: an emerging frontier." Nat Rev Immunol **11**(2): 81.
114. Mayer-Barber, K. D., B. B. Andrade, D. L. Barber, S. Hieny, C. G. Feng, P. Caspar, S. Oland, S. Gordon and A. Sher (2011). "Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection." Immunity **35**(6): 1023-1034.
115. Mayer-Barber, K. D. and D. L. Barber (2015). "Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection." Cold Spring Harb Perspect Med **5**(12).
116. Mayer-Barber, K. D., D. L. Barber, K. Shenderov, S. D. White, M. S. Wilson, A. Cheever, D. Kugler, S. Hieny, P. Caspar, G. Nunez, D. Schlueter, R. A. Flavell, F. S. Sutterwala and A. Sher (2010). "Caspase-1 independent IL-1 β production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo." J Immunol **184**(7): 3326-3330.
117. Mazmanian, S. K., J. L. Round and D. L. Kasper (2008). "A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease." Nature **453**(7195): 620-625.
118. Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller and A. Mortha (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting." Annu Rev Immunol **31**: 563-604.
119. Mihret, A. (2012). "The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection." Virulence **3**(7): 654-659.
120. Mildner, A. and S. Jung (2014). "Development and function of dendritic cell subsets." Immunity **40**(5): 642-656.
121. Mishra, B. B., P. Moura-Alves, A. Sonawane, N. Hacohen, G. Griffiths, L. F. Moita and E. Anes (2010). "Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome." Cell Microbiol **12**(8): 1046-1063.
122. Mishra, B. B., V. A. Rathinam, G. W. Martens, A. J. Martinot, H. Kornfeld, K. A. Fitzgerald and C. M. Sasseti (2013). "Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β ." Nat Immunol **14**(1): 52-60.
123. Morais Fonseca, D., R. S. Rosada, M. O. e Paula, P. F. Wowk, L. H. Franco, E. G. Soares, C. L. Silva and V. L. Deperon Bonato (2010). "Experimental tuberculosis: designing a better model to test vaccines against tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **90**(2): 135-142.
124. Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki and R. Nagai (2009). "CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." Nat Med **15**(8): 914-920.

125. Nunes-Alves, C., M. G. Booty, S. M. Carpenter, P. Jayaraman, A. C. Rothchild and S. M. Behar (2014). "In search of a new paradigm for protective immunity to TB." Nat Rev Microbiol **12**(4): 289-299.
126. O'Brien, K. B., P. Vogel, S. Duan, E. A. Govorkova, R. J. Webby, J. A. McCullers and S. Schultz-Cherry (2012). "Impaired wound healing predisposes obese mice to severe influenza virus infection." J Infect Dis **205**(2): 252-261.
127. O'Garra, A., P. S. Redford, F. W. McNab, C. I. Bloom, R. J. Wilkinson and M. P. Berry (2013). "The immune response in tuberculosis." Annu Rev Immunol **31**: 475-527.
128. Orme, I. M., R. T. Robinson and A. M. Cooper (2015). "The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung." Nat Immunol **16**(1): 57-63.
129. Osborn, O., S. E. Brownell, M. Sanchez-Alavez, D. Salomon, H. Gram and T. Bartfai (2008). "Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity." Cytokine **44**(1): 141-148.
130. Osborn, O. and J. M. Olefsky (2012). "The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease." Nat Med **18**(3): 363-374.
131. Ouchi, N., J. L. Parker, J. J. Lugus and K. Walsh (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." Nat Rev Immunol **11**(2): 85-97.
132. Pai, M., M. A. Behr, D. Dowdy, K. Dheda, M. Divangahi, C. C. Boehme, A. Ginsberg, S. Swaminathan, M. Spigelman, H. Getahun, D. Menzies and M. Raviglione (2016). "Tuberculosis." Nat Rev Dis Primers **2**: 16076.
133. Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
134. Park, J., C. J. Goergen, H. HogenEsch and C. H. Kim (2016). "Chronically Elevated Levels of Short-Chain Fatty Acids Induce T Cell-Mediated Ureteritis and Hydronephrosis." J Immunol **196**(5): 2388-2400.
135. Peddireddy, V., S. N. Doddam and N. Ahmed (2017). "Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis." Front Immunol **8**: 84.
136. Peng, L., Z. R. Li, R. S. Green, I. R. Holzman and J. Lin (2009). "Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers." J Nutr **139**(9): 1619-1625.
137. Pereira, S. S. and J. I. Alvarez-Leite (2014). "Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes." Curr Obes Rep **3**(4): 422-431.
138. Piñeros, A. R., L. W. Campos, D. M. Fonseca, T. B. Bertolini, A. F. Gembre, R. Q. Prado, J. C. Alves-Filho, S. G. Ramos, M. Russo and V. L. Bonato (2017). "M2 macrophages or IL-33 treatment attenuate ongoing Mycobacterium tuberculosis infection." Sci Rep **7**: 41240.
139. Puddu, A., R. Sanguineti, F. Montecucco and G. L. Viviani (2014). "Evidence for the gut microbiota short-chain fatty acids as key pathophysiological molecules improving diabetes." Mediators Inflamm **2014**: 162021.
140. Rabot, S., M. Membrez, F. Blancher, B. Berger, D. Moine, L. Krause, R. Bibiloni, A. Bruneau, P. Gérard, J. Siddharth, C. L. Lauber and C. J. Chou (2016).

- "High fat diet drives obesity regardless the composition of gut microbiota in mice." *Sci Rep* **6**: 32484.
141. Randall, K., N. Henderson, J. Reens, S. Eckersley, A. C. Nyström, M. C. South, C. A. Balendran, G. Böttcher, G. Hughes and S. A. Price (2016). "Claudin-2 Expression Levels in Ulcerative Colitis: Development and Validation of an In-Situ Hybridisation Assay for Therapeutic Studies." *PLoS One* **11**(9): e0162076.
 142. Redford, P. S., P. J. Murray and A. O'Garra (2011). "The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection." *Mucosal Immunol* **4**(3): 261-270.
 143. Reeves, P. G., F. H. Nielsen and G. C. Fahey, Jr. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." *J Nutr* **123**(11): 1939-1951.
 144. Reilly, S. M. and A. R. Saltiel (2017). "Adapting to obesity with adipose tissue inflammation." *Nat Rev Endocrinol* **13**(11): 633-643.
 145. Rheinheimer, J., B. M. de Souza, N. S. Cardoso, A. C. Bauer and D. Crispim (2017). "Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review." *Metabolism* **74**: 1-9.
 146. Ribeiro-Rodrigues, R., T. Resende Co, R. Rojas, Z. Toossi, R. Dietze, W. H. Boom, E. Maciel and C. S. Hirsch (2006). "A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis." *Clin Exp Immunol* **144**(1): 25-34.
 147. Ringling, R. E., M. L. Gastecki, M. L. Woodford, K. J. Lum-Naihe, R. W. Grant, L. Pulakat, V. J. Vieira-Potter and J. Padilla (2016). "Loss of Nlrp3 Does Not Protect Mice from Western Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation and Glucose Intolerance." *PLoS One* **11**(9): e0161939.
 148. Ryu, Y. J. (2015). "Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms." *Tuberc Respir Dis (Seoul)* **78**(2): 64-71.
 149. Sakai, S., K. D. Kauffman, M. A. Sallin, A. H. Sharpe, H. A. Young, V. V. Ganusov and D. L. Barber (2016). "CD4 T Cell-Derived IFN- γ Plays a Minimal Role in Control of Pulmonary Mycobacterium tuberculosis Infection and Must Be Actively Repressed by PD-1 to Prevent Lethal Disease." *PLoS Pathog* **12**(5): e1005667.
 150. Samuelson, D. R., D. A. Welsh and J. E. Shellito (2015). "Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota." *Front Microbiol* **6**: 1085.
 151. Sasindran, S. J. and J. B. Torrelles (2011). "Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium?" *Front Microbiol* **2**: 2.
 152. Schmidt, F. M., J. Weschenfelder, C. Sander, J. Minkwitz, J. Thormann, T. Chittka, R. Mergl, K. C. Kirkby, M. Faßhauer, M. Stumvoll, L. M. Holdt, D. Teupser, U. Hegerl and H. Himmerich (2015). "Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity." *PLoS One* **10**(3): e0121971.
 153. Schroeder, B. O. and F. Bäckhed (2016). "Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease." *Nat Med* **22**(10): 1079-1089.

154. Scott-Browne, J. P., S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan and K. B. Urdahl (2007). "Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis." *J Exp Med* **204**(9): 2159-2169.
155. Scriba, T. J., A. K. Coussens and H. A. Fletcher (2016). "Human Immunology of Tuberculosis." *Microbiol Spectr* **4**(5).
156. Seah, G. T., G. M. Scott and G. A. Rook (2000). "Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis." *J Infect Dis* **181**(1): 385-389.
157. Seo, S. U., N. Kamada, R. Muñoz-Planillo, Y. G. Kim, D. Kim, Y. Koizumi, M. Hasegawa, S. D. Himpfl, H. P. Browne, T. D. Lawley, H. L. Mobley, N. Inohara and G. Núñez (2015). "Distinct Commensals Induce Interleukin-1 β via NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Monocytes to Promote Intestinal Inflammation in Response to Injury." *Immunity* **42**(4): 744-755.
158. Shafiani, S., G. Tucker-Heard, A. Kariyone, K. Takatsu and K. B. Urdahl (2010). "Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis." *J Exp Med* **207**(7): 1409-1420.
159. Shah, D., F. Romero, M. Duong, N. Wang, B. Paudyal, B. T. Suratt, C. B. Kallen, J. Sun, Y. Zhu, K. Walsh and R. Summer (2015). "Obesity-induced adipokine imbalance impairs mouse pulmonary vascular endothelial function and primes the lung for injury." *Sci Rep* **5**: 11362.
160. Shaler, C. R., C. N. Horvath, M. Jeyanathan and Z. Xing (2013). "Within the Enemy's Camp: contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of Mycobacterium tuberculosis." *Front Immunol* **4**: 30.
161. Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin and J. S. Flier (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." *J Clin Invest* **116**(11): 3015-3025.
162. Shin, N. R., T. W. Whon and J. W. Bae (2015). "Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota." *Trends Biotechnol* **33**(9): 496-503.
163. Shore, S. A. and Y. Cho (2016). "Obesity and Asthma: Microbiome-Metabolome Interactions." *Am J Respir Cell Mol Biol* **54**(5): 609-617.
164. Sica, A. and A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." *J Clin Invest* **122**(3): 787-795.
165. Singh, N., A. Gurav, S. Sivaprakasam, E. Brady, R. Padia, H. Shi, M. Thangaraju, P. D. Prasad, S. Manicassamy, D. H. Munn, J. R. Lee, S. Offermanns and V. Ganapathy (2014). "Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis." *Immunity* **40**(1): 128-139.
166. Smith, A. G., P. A. Sheridan, J. B. Harp and M. A. Beck (2007). "Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus." *J Nutr* **137**(5): 1236-1243.
167. Smith, A. G., P. A. Sheridan, R. J. Tseng, J. F. Sheridan and M. A. Beck (2009). "Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8⁺ T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus." *Immunology* **126**(2): 268-279.

168. Somoskövi, A., G. Zissel, P. F. Zipfel, M. W. Ziegenhagen, J. Klaucke, H. Haas, M. Schlaak and J. Müller-Quernheim (1999). "Different cytokine patterns correlate with the extension of disease in pulmonary tuberculosis." *Eur Cytokine Netw* **10**(2): 135-142.
169. Stienstra, R., J. A. van Diepen, C. J. Tack, M. H. Zaki, F. L. van de Veerdonk, D. Perera, G. A. Neale, G. J. Hooiveld, A. Hijmans, I. Vroegrijk, S. van den Berg, J. Romijn, P. C. Rensen, L. A. Joosten, M. G. Netea and T. D. Kanneganti (2011). "Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(37): 15324-15329.
170. Strissel, K. J., J. DeFuria, M. E. Shaul, G. Bennett, A. S. Greenberg and M. S. Obin (2010). "T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice." *Obesity (Silver Spring)* **18**(10): 1918-1925.
171. Sánchez, D., M. Rojas, I. Hernández, D. Radzioch, L. F. García and L. F. Barrera (2010). "Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage death." *Cell Immunol* **260**(2): 128-136.
172. Sérgio, C. A., T. B. Bertolini, A. F. Gembre, R. Q. Prado and V. L. Bonato (2015). "CD11c(+) CD103(+) cells of Mycobacterium tuberculosis-infected C57BL/6 but not of BALB/c mice induce a high frequency of interferon- γ - or interleukin-17-producing CD4(+) cells." *Immunology* **144**(4): 574-586.
173. Thaïss, C. A., M. Levy, I. Grosheva, D. Zheng, E. Soffer, E. Blacher, S. Braverman, A. C. Tengeler, O. Barak, M. Elazar, R. Ben-Zeev, D. Lehavi-Regev, M. N. Katz, M. Pevsner-Fischer, A. Gertler, Z. Halpern, A. Harmelin, S. Aamar, P. Serradas, A. Grosfeld, H. Shapiro, B. Geiger and E. Elinav (2018). "Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection." *Science* **359**(6382): 1376-1383.
174. Tomioka, H., Y. Tatano, W. W. Maw, C. Sano, Y. Kanehiro and T. Shimizu (2012). "Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages." *Clin Dev Immunol* **2012**: 635451.
175. Torrado, E. and A. M. Cooper (2010). "IL-17 and Th17 cells in tuberculosis." *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(6): 455-462.
176. Torrelles, J. B. and L. S. Schlesinger (2017). "Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis." *Trends Microbiol* **25**(8): 688-697.
177. Trompette, A., E. S. Gollwitzer, K. Yadava, A. K. Sichelstiel, N. Sprenger, C. Ngom-Bru, C. Blanchard, T. Junt, L. P. Nicod, N. L. Harris and B. J. Marsland (2014). "Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis." *Nat Med* **20**(2): 159-166.
178. Tsao, T. C., C. C. Huang, W. K. Chiou, P. Y. Yang, M. J. Hsieh and K. C. Tsao (2002). "Levels of interferon-gamma and interleukin-2 receptor-alpha for bronchoalveolar lavage fluid and serum were correlated with clinical grade and treatment of pulmonary tuberculosis." *Int J Tuberc Lung Dis* **6**(8): 720-727.
179. Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis and J. I. Gordon (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* **444**(7122): 1027-1031.

180. van Crevel, R., E. Karyadi, F. Preyers, M. Leenders, B. J. Kullberg, R. H. Nelwan and J. W. van der Meer (2000). "Increased production of interleukin 4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities." *J Infect Dis* **181**(3): 1194-1197.
181. Vandanmagsar, B., Y. H. Youm, A. Ravussin, J. E. Galgani, K. Stadler, R. L. Mynatt, E. Ravussin, J. M. Stephens and V. D. Dixit (2011). "The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance." *Nat Med* **17**(2): 179-188.
182. Wan, T., G. Yuan, Y. Ren, Z. Zuo, Z. Wang, Y. Jia, H. Cui, X. Peng, J. Fang, J. Deng, S. Yu, Y. Hu, L. Shen, X. Ma, Y. Wang and Z. Ren (2016). "Diet-induced obese mice exhibit altered immune responses to acute lung injury induced by Escherichia coli." *Obesity (Silver Spring)* **24**(10): 2101-2110.
183. Wang, Y., J. B. Mumm, R. Herbst and R. Kolbeck (2017). "IL-22 Increases Permeability of Intestinal Epithelial Tight Junctions by Enhancing Claudin-2 Expression." *J Immunol* **199**(9): 3316-3325.
184. Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1796-1808.
185. Weiss, G. and U. E. Schaible (2015). "Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria." *Immunol Rev* **264**(1): 182-203.
186. WHO (2017). Tuberculosis.
187. WHO (2018). Obesity and overweight.
188. WHO (2018). Tuberculosis.
189. Wieland, C. W., S. Florquin, E. D. Chan, J. C. Leemans, S. Weijer, A. Verbon, G. Fantuzzi and T. van der Poll (2005). "Pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in leptin-deficient ob/ob mice." *Int Immunol* **17**(11): 1399-1408.
190. Winglee, K., E. Eloee-Fadros, S. Gupta, H. Guo, C. Fraser and W. Bishai (2014). "Aerosol Mycobacterium tuberculosis infection causes rapid loss of diversity in gut microbiota." *PLoS One* **9**(5): e97048.
191. Womack, J., P. C. Tien, J. Feldman, J. H. Shin, K. Fennie, K. Anastos, M. H. Cohen, M. C. Bacon and H. Minkoff (2007). "Obesity and immune cell counts in women." *Metabolism* **56**(7): 998-1004.
192. Wu, H. J. and E. Wu (2012). "The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity." *Gut Microbes* **3**(1): 4-14.
193. Wu, Y., T. Wu, J. Wu, L. Zhao, Q. Li, Z. Varghese, J. F. Moorhead, S. H. Powis, Y. Chen and X. Z. Ruan (2013). "Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet." *J Endocrinol* **219**(3): 195-204.
194. Yen, Y. F., H. Y. Hu, Y. L. Lee, P. W. Ku, I. F. Lin, D. Chu and Y. J. Lai (2017). "Obesity/overweight reduces the risk of active tuberculosis: a nationwide population-based cohort study in Taiwan." *Int J Obes (Lond)* **41**(6): 971-975.
195. Yin, Y. N., Q. F. Yu, N. Fu, X. W. Liu and F. G. Lu (2010). "Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats." *World J Gastroenterol* **16**(27): 3394-3401.

196. Yin, Z., T. Deng, L. E. Peterson, R. Yu, J. Lin, D. J. Hamilton, P. R. Reardon, V. Sherman, G. E. Winnier, M. Zhan, C. J. Lyon, S. T. Wong and W. A. Hsueh (2014). "Transcriptome analysis of human adipocytes implicates the NOD-like receptor pathway in obesity-induced adipose inflammation." Mol Cell Endocrinol **394**(1-2): 80-87.
197. Zaldivar, F., R. G. McMurray, D. Nemet, P. Galassetti, P. J. Mills and D. M. Cooper (2006). "Body fat and circulating leukocytes in children." Int J Obes (Lond) **30**(6): 906-911.
198. Zhang, H., J. K. DiBaise, A. Zuccolo, D. Kudrna, M. Braidotti, Y. Yu, P. Parameswaran, M. D. Crowell, R. Wing, B. E. Rittmann and R. Krajmalnik-Brown (2009). "Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(7): 2365-2370.
199. Zhao, G., M. Nyman and J. A. Jönsson (2006). "Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography." Biomed Chromatogr **20**(8): 674-682.
200. Zihni, C., C. Mills, K. Matter and M. S. Balda (2016). "Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates." Nat Rev Mol Cell Biol **17**(9): 564-580.

ANEXOS

Anexo 1. Análise da citometria de fluxo da fluorescência menos uma (FMO-*Fluorescence minus one*) para as populações de células T CD4⁺ IL-17⁺ e IFN- γ ⁺ no pulmão de animais C57BL/6 WT. FMO da população negativa CD4 (a). A partir da população de CD4⁺ delimitada pela FMO, foram selecionadas as FMO das populações IFN- γ e IL-17 (b).

Anexo 2. Análise da citometria de fluxo da FMO para as células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ no pulmão de animais C57BL/6 WT. FMO da população dupla negativa CD4 Foxp3.

Anexo 3. Análise da citometria de fluxo da FMO para as células dendríticas no pulmão de animais C57BL/6 WT. FMO da população dupla negativa CD11c MHCII (a). A partir da população dupla positiva CD11c⁺MHCII⁺ delimitada pela FMO, foram selecionadas as FMO das populações CD103 e CD11b (b).

Anexo 4. Análise da citometria de fluxo da FMO para as células dendríticas produtoras de IL-6 no pulmão de animais C57BL/6 WT. FMO da população dupla negativa CD11c MHCII (a). A partir da população dupla positiva CD11c⁺MHCII⁺ delimitada pela FMO, foram selecionadas as FMO das populações CD11b e IL-6(b).

Anexo 5. Análise da citometria de fluxo da FMO para as células dendríticas produtoras de IL-1 β no pulmão de animais C57BL/6 WT. FMO da população dupla negativa CD11c MHCII (a). A partir da população dupla positiva CD11c⁺MHCII⁺ delimitada pela FMO, foram selecionadas as FMO das populações CD11b e IL-1 β (b).

Anexo 6. Análise da citometria de fluxo da FMO para as células dendríticas convencionais (cDC) no linfonodo do mediastino de animais C57BL/6 WT. FMO da população negativa CD11c(a). A partir da população positiva CD11c⁺ delimitada pela FMO, foram selecionadas as FMO das populações MHCII e CD8 α (b). FMO das populações negativas CD11b e IL-6 a partir das populações cDC1 e cDC2 (c).

Anexo 7. Análise da citometria de fluxo da FMO para os macrófagos CD16/32⁺ (M1) no pulmão de animais C57BL/6 WT. FMO da população negativa F4/80 (a). A partir da população positiva F4/80⁺ delimitada pela FMO, foram selecionadas as FMO das populações CD11c e CD11b (b). FMO da população CD16/32 a partir da população CD11b⁺CD11c⁺ analisada pela FMO (c).

Anexo 8. Análise da citometria de fluxo da FMO das populações de monócitos e neutrófilos no pulmão de animais C57BL/6 WT. FMO das populações CD11b e Ly6C para monócitos (a). FMO das populações CD11b e Ly6G para neutrófilos (b).

Anexo 9. Análise da citometria de fluxo da FMO da população CD4 produtoras de IFN-γ no pulmão de animais NLRP3^{-/-}. FMO das populações CD4 e IFN-γ (a).