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

RÔMULO SILVA DE OLIVEIRA

Avaliação do eixo IL-1/IL-1R na comorbidade obesidade e tuberculose

Ribeirão Preto

2018

RÔMULO SILVA DE OLIVEIRA

Avaliação do eixo IL-1/IL-1R na comorbidade obesidade e tuberculose

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

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.

S. de Oliveira, Rômulo

Avaliação do eixo IL-1/IL-1R na comorbidade obesidade e tuberculose.

Ribeirão Preto, 2018.

132 p.:il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Bonato, Vânia Luiza Deperon

1. Tuberculose 2. IL-1 α / β 3. Obesidade 4. Metainflamação

Nome: S. de Oliveira, Rômulo

Título: Avaliação do eixo IL-1/IL-1R na comorbidade obesidade e tuberculose

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação com muito amor e gratidão a todos aqueles que acreditaram que um dia eu poderia chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À **Professora Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato**, pela inesgotável paciência, trabalho, dedicação e preocupação com minha formação; obrigado pela oportunidade e orientação insubstituível;

Ao **Professor Dr. João Santana da Silva**, um exemplo de dedicação a ciência, por ter nos acolhido em seu laboratório, por todo o aprendizado, e por ter se colocado à disposição durante todo o período do mestrado;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões;

Aos meus amados pais **Vainer Vaz de Oliveira** e **Lucimar Silva de Oliveira** e a minha adorada avó **Maria Diva Vaz**, pelo amor, suporte, educação e pelas mensagens de determinação e foco;

Aos meus queridos colegas de laboratório, **Annie Piñeros**, **Douglas Santos**, **Sandra Palma**, **Tamara Rodrigues** e **Thaís Bertolini** pelos ensinamentos, companheirismo e suporte profissional;

As técnicas, **Ana Flávia Gembre**, **Cristiane Milanezi**, **Denise Ferraz**, **Elaine Floriano** e **Izaíra Brandão** pela ajuda insubstituível durante os experimentos;

À **Professora Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho** pelo auxílio e realização das análises histopatológicas;

Aos **animais**, que com muito respeito foram modelos para atestar nossas hipóteses;

À **Alana Felix** e ao nosso amado felino **Interferon**, pelo carinho e compreensão em todos os momentos;

Aos que tocaram a minha vida e o meu coração e me apoiaram em todas as situações, **Amanda Goulart**, **Daniel Cardoso** e **Guilherme Mazzei**;

Aos meus amigos de pós-graduação, que me recebem de braços abertos nos melhores e piores momentos, e que fazem minha vida mais completa e feliz, **Camila, Ítala, Josiane, Leandro, Luiz, Luna, Mouzarllem, Naira, Pedro e Rafaela;**

Aos meus colegas dos laboratórios vizinhos, **Ana Paula Masson, Cleyson Oliveira, Herculano da Silva, Jefferson Leite, Lais Sacramento, Nathalia Ketelut, Ricardo Souza, Wendy Rios** pelas conversas e apoio de todos os dias;

Aos bioteristas, **Rubilan Quineiro, Edinelson Mazzotto e Adriana Sestari** pela atenção e colaboração diária;

Em especial à estimada secretária **Ana Cristine**, pela atenção, acolhimento e aconselhamento;

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada**, representado pelos docentes, pela contribuição durante a minha formação científica e intelectual;

À **FAPESP, CNPq, CAPES e FAEPA** pelo incentivo financeiro;

E a todos que de alguma forma ajudaram a concluir esse trabalho.

"Um dia é preciso parar de sonhar e,
de algum modo, partir." - **Amyr Klink**

"Science is not only a disciple of reason but,
also, one of romance and passion." - **Stephen Hawking**

S. DE OLIVEIRA, RÔMULO. **Avaliação do eixo IL-1/IL-1R na comorbidade obesidade e tuberculose**. 2018. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A tuberculose (TB) transmitida pelo *Mycobacterium tuberculosis* está entre as doenças que mais matam no mundo. O excesso de inflamação é deletério na TB e está presente em quadros de comorbidade. Nossa hipótese de estudo foi fundamentada em dados da literatura que mostram: 1- a obesidade pode agravar o desenvolvimento de infecções no trato respiratório; 2- a obesidade induz inflamação sistêmica de baixo grau; 3- nos países de baixa e média renda, onde são notificados o maior número de casos de tuberculose, desnutrição e obesidade coexistem, atualmente. Nosso objetivo foi investigar se a inflamação decorrente de alimentação com dieta hiperlipídica acentuava a inflamação pulmonar dependente do eixo IL-1/IL-1R (IL-1 *Receptor*) na tuberculose experimental. Nossa hipótese foi embasada no fato de que o eixo IL-1/IL-1R participa da inflamação decorrente da obesidade e confere proteção contra a tuberculose experimental. Porém, a ativação excessiva do IL-1R pode causar imunopatologia na tuberculose. Resultados prévios do laboratório mostram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD – *High Fat Diet*) acentua a inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção. Os resultados mostram que na ausência do receptor para IL-1 (IL-1R^{-/-}) ou na ausência de IL-1α (IL-1α^{-/-}), camundongos alimentados com HFD tiveram aumento de peso corporal, aumento de peso dos tecidos adiposos, hipertrofia dos adipócitos e hiperglicemia quando comparados aos respectivos grupos IL-1R^{-/-} ou IL-1α^{-/-} alimentados com dieta padrão (LFD – *Low Fat Diet*). A ausência do receptor para IL-1 (IL-1R^{-/-}) em animais obesos reduziu a inflamação pulmonar, e a frequência de neutrófilos e de células CD4⁺IL-17⁺, porém não afetou a suscetibilidade à infecção quando comparados ao grupo WT (*Wild Type*) obeso. Sabendo que o IL-1R interage com IL-1β e com IL-1α, mostramos que o tratamento com anticorpo contra IL-1β reduziu a inflamação pulmonar e aumentou a resistência dos animais obesos comparados aos animais obesos que não foram tratados. Entretanto, animais deficientes para IL-1α tiveram exacerbação da inflamação pulmonar, acompanhada de redução de células CD4⁺IL-17⁺ e foram mais suscetíveis à infecção do que os animais WT obesos. Do contrário, o tratamento de animais IL-1α^{-/-} obesos com IL-1α recombinante reduziu a inflamação, aumentou as células CD4⁺IL-17⁺ e a resistência à infecção. Em síntese, os resultados mostram que na comorbidade obesidade e tuberculose, o eixo IL-1/IL-1R participa da indução da inflamação pulmonar, sendo a IL-1β associada com aumento da inflamação e da suscetibilidade, e a IL-1α com redução da inflamação e com resistência à infecção por *M. tuberculosis*. Palavras-chave: Tuberculose, IL-1α/β, Obesidade e Metainflamação

S. DE OLIVEIRA, RÔMULO. **Evaluation of the IL-1/IL-1R axis in obesity and tuberculosis comorbidity**. 2018. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Tuberculosis (TB) transmitted by *Mycobacterium tuberculosis* is among the most deadly diseases in the world. Excess inflammation is deleterious in TB and is present in comorbidities. Our hypothesis was based on data from the literature that show: 1- obesity can aggravate the development of infections in the respiratory tract; 2- obesity induces low-grade systemic inflammation; 3- in low- and middle-income countries, where they are reported the highest number of cases of tuberculosis, malnutrition and obesity coexist, currently. Our objective was to investigate whether inflammation due to hyperlipidic diet accentuated the IL-1/IL-1R (IL-1 Receptor) axis dependent pulmonary inflammation in experimental tuberculosis. Our hypothesis was based on the fact that the IL-1/IL-1R axis participates in inflammation due to obesity and also provides protection against experimental tuberculosis. However, excessive activation of IL-1R may cause immunopathology in tuberculosis. Previous laboratory results show that obesity induced by a high-fat diet (HFD) accentuates pulmonary inflammation and susceptibility to infection. The results of the present study show that in the absence of the IL-1 receptor (IL-1R^{-/-}) or in the absence of IL-1 α (IL-1 α ^{-/-}), HFD- weight gain of adipose tissues, adipocyte hypertrophy and hyperglycemia when compared to the respective IL-1R^{-/-} or IL-1 α ^{-/-} groups fed with standard diet (LFD). The absence of the IL-1 (IL-1R^{-/-}) receptor in obese animals reduced lung inflammation, and the frequency of neutrophils and CD4⁺ IL-17⁺ cells, but did not affect the susceptibility to infection when compared to the group WT (Wild Type) obese. Knowing that IL-1R interacts with IL-1 α and IL-1 β , we show that IL-1 β antibody treatment reduced lung inflammation and increased the resistance of obese animals compared to obese animals that were not treated. However, IL-1 α deficient animals had an exacerbation of lung inflammation, accompanied by a reduction of CD4⁺ IL-17⁺ cells and were more susceptible to infection than obese WT animals. Otherwise, treatment of obese IL-1 α ^{-/-} animals with recombinant IL-1 α reduced inflammation, increased CD4⁺ IL-17⁺ cells and resistance to infection. In summary, the results show that in the comorbidity obesity and tuberculosis, the IL-1/IL-1R axis participates in the induction of pulmonary inflammation, IL-1 β is associated with increased inflammation and susceptibility, and IL-1 α with reduced inflammation and resistance to *M. tuberculosis* infection.

Keywords: Tuberculosis, IL-1 α / β , Obesity and Metainflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de IL-1 β e IL-1 α nos homogenatos de pulmões de animais obesos e infectados.	53
Figura 2. Avaliação dos parâmetros da obesidade durante a infecção com <i>M. tuberculosis</i> nos animais deficientes para expressão do receptor IL-1R ou de IL-1 α	55
Figura 3. Expressão gênica de IL-1 β e IL-1 α no tecido adiposo dos animais WT e IL-1 $\alpha^{-/-}$, obesos.	58
Figura 4. Avaliação da glicemia nos animais WT, IL-1R $^{-/-}$ e IL-1 $\alpha^{-/-}$, obesos e infectados.	61
Figura 5. Avaliação do número de bacilos nos animais IL-1R $^{-/-}$ obesos.	64
Figura 6. Frequência de células dendríticas CD11c $^{+}$ CD11b $^{+}$ e CD11c $^{+}$ CD103 $^{+}$ nos animais WT e IL-1R $^{-/-}$, obesos.	66
Figura 7. Frequência de monócitos CD11b $^{+}$ Ly6Chigh nos animais WT e IL-1R $^{-/-}$, obesos.	67
Figura 8. Frequência de neutrófilos CD11b $^{+}$ Ly6G $^{+}$ nos animais WT e IL-1R $^{-/-}$, obesos.	68
Figura 9. Avaliação de células CD4 $^{+}$ produtoras de IFN- γ ou IL-17 nos pulmões dos animais IL-1R $^{-/-}$ obesos.	71
Figura 10. Animais obesos tratados com Anti-IL- β	73
Figura 11. Análise da carga bacilar em animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ obesos.	75
Figura 12. Animais obesos IL-1 $\alpha^{-/-}$ tratados com IL- α recombinante.	76
Figura 13. Avaliação de células CD4 $^{+}$ produtoras de IFN- γ ou IL-17 nos pulmões dos animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ obesos, e tratados com IL-1 α recombinante.	78
Figura 14. Correlações entre CFU, células CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} ou CD4 $^{+}$ IL-17 $^{+}$	79
Figura 15. Concentrações de IL-6 e nitrito no sobrenadante de macrófagos WT obesos e infectados.	81
Figura 16. Concentração de IL-6 e IL-1 β no sobrenadante de macrófagos IL-1 $\alpha^{-/-}$	81
Figura 17. Frequência de macrófagos CD11b $^{+}$ CD11c $^{+}$ e CD11b low CD11c $^{+}$ nos animais WT e IL-1 $\alpha^{-/-}$, obesos.	82
Figura 18. Análise da frequência de células CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} e CD4 $^{+}$ IL-17 $^{+}$ em cocultura de células dendríticas de animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ com células CD4 $^{+}$ de animais infectados.	85
Figura 19. Frequência de células dendríticas CD11c $^{+}$ CD11b $^{+}$ e CD11c $^{+}$ CD103 $^{+}$ nos animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ obesos.	85
Figura 20. Avaliação de monócitos inflamatórios e neutrófilos em animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ obesos.	87

Figura 21. Análise da microbiota comensal nas fezes de animais IL-1 α obesos.....	88
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes para LFD e HFD.....	40
Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo.....	45
Tabela 3. Sequência de primers utilizados durante a reação de PCR em tempo real.	47
Tabela 4. Limite de detecção dos kits imunoenzimáticos.....	48
Tabela 5. Sequência dos primers para a análise da microbiota.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFU – Unidades Formadoras de Colônia

DC – *Dendritic cells*

GM-CSF - *Granulocyte-Macrophage Colony–Stimulating Factor*

HE – Hematoxilina & Eosina

HFD – *High Fat Diet*

IFN- γ – *Interferon-gamma*

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-10 - Interleucina 10

IL-17 - Interleucina 17

IL-1R^{-/-} - animais deficientes do receptor IL-1R

IL-1 α - Interleucina 1 α

IL-1 α ^{-/-} - animais deficientes da interleucina IL-1 α

IL-23 - Interleucina 23

IL-6 - Interleucina 6

LFD – *Low Fat Diet*

LPS – Lipopolissacarídeo

M1 – Macrófagos ativados classicamente

M2 – Macrófagos ativados alternativamente

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

NLRP3 – *NLR Family pyrin domain containing-3*

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*

TCR - T Cell Receptor

TGF- β - *Transforming growth factor β*

Th – *T- helper*

T_H1- *T Helper 1*

T_H17 - *T Helper 17*

TLR – *Toll-like Receptors*

TNF - *Tumor necrosis factor alpha*

Treg - T reguladora

WT – *Wild Type*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Indução, ativação e efetuação da resposta imunológica e da resposta inflamatória contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
1.2. Obesidade, metainflamação e resposta imunológica	27
1.3. IL-1 α / β e IL-1R	31
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo Geral	38
3.2. Objetivos Específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Animais	39
4.2. Grupos de animais	39
4.3. Dieta dos animais	39
4.4. Preparo do inóculo de <i>M. tuberculosis</i>	40
4.5. Infecção intra-traqueal	41
4.6. Parâmetros da indução de obesidade	41
4.7. Isolamento e Cultivo de Leucócitos pulmonares	42
4.8. Citometria de fluxo	43
4.9. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (CFU)	45
4.10. Análise histopatológica	46
4.11. Extração de RNA do tecido adiposo	46
4.12. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em Tempo Real	47
4.13. Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)	48
4.14. Diferenciação de macrófagos (BMDMs) e células dendríticas (BMDCs) a partir de precursores de medula óssea	48
4.15. Ensaio de Killing e Fagocitose	49
4.16. Ensaio de cocultura de BMDCs de animais infectados e submetidos a dieta e células CD4 ⁺ de animais WT infectados	49
4.17. Tratamento com anticorpo anti-IL-1 β em animais WT submetidos a dieta	50

4.18. Reconstituição dos animais IL-1 α ^{-/-}	50
4.19. Análise da microbiota	51
4.19.1. Extração do DNA das fezes	51
4.20. Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1. Produção de IL-1 β e IL-1 α nos homogenatos de pulmões de animais obesos e infectados	53
5.2. Avaliação dos parâmetros da obesidade durante a infecção com <i>M. tuberculosis</i> nos animais deficientes para expressão do receptor IL-1R ou de IL-1 α	54
5.3. Expressão de IL-1 β e IL-1 α no tecido adiposo dos animais WT e IL-1 α ^{-/-} , obesos... 56	
5.4. Avaliação da glicemia nos animais WT, IL-1R ^{-/-} e IL-1 α ^{-/-} , obesos e infectados	59
5.5. Avaliação do número de bacilos nos animais IL-1R ^{-/-} obesos	62
5.6. Análise dos leucócitos da imunidade inata nos pulmões dos animais IL-1R ^{-/-} obesos	65
5.7. Avaliação de células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-17 nos pulmões dos animais IL-1R ^{-/-} obesos.....	69
5.8. Animais obesos tratados com anti-IL-1 β	72
5.9. Análise da carga bacilar em animais IL-1 α ^{-/-} obesos e tratados com IL-1 α recombinante	74
5.10. Avaliação de células CD4 ⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-17 nos pulmões dos animais IL-1 α ^{-/-} obesos, e tratados com IL-1 α recombinante.....	77
5.11. Caracterização <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de macrófagos de animais WT e deficientes para IL-1 α , obesos.....	80
5.12. Análise da frequência de células CD4 ⁺ IFN γ ⁺ e CD4 ⁺ IL-17 ⁺ em cocultura de células dendríticas de animais IL-1 α ^{-/-} com células CD4 ⁺ de animais infectados.....	83
5.13. Avaliação de monócitos inflamatórios e neutrófilos em animais IL-1 α ^{-/-} obesos	86
5.14. Análise da microbiota comensal nas fezes de animais IL-1 α obesos	88
6. DISCUSSÃO	89
7. SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	97
8. CONCLUSÃO	98

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
10. ANEXOS	132

1. INTRODUÇÃO

1.1. Indução, ativação e efetuação da resposta imunológica e da resposta inflamatória contra *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) é um patógeno intracelular obrigatório caracterizado como agente etiológico da tuberculose pelo médico alemão Robert Koch em meados de 1882 (Kock 1885). Apesar de grande parte dos casos serem assintomáticos e das grandes campanhas de vacinação intervirem na incidência, a tuberculose é ainda considerada um problema de saúde pública (Schito et al. 2015). Além disso, é a única doença infecciosa entre as dez doenças que mais matam no mundo (WHO 2017). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization) em 2016, 6,3 milhões de casos foram reportados e 10,4 milhões de pessoas ficaram doentes: 90% eram adultos, 65% eram do sexo masculino, 10% eram pessoas co-infectadas pelo HIV (74% na África). Mais da metade dos casos reportados (56%) concentra-se em cinco países: Índia, Indonésia, China, Filipinas e Paquistão. A estimativa atual é que no total 1,3 milhões de indivíduos morreram em consequência da doença no ano de 2016 (WHO 2017).

Apesar da redução da mortalidade nas últimas duas décadas, o Brasil permanece entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos de tuberculose do mundo, sendo a mortalidade de 2.3 pessoas para cada 100 mil habitantes. Os países que fazem parte da lista “*high burden countries*” destacam-se pelo aumento de casos de coinfeção com HIV (TB/HIV) e pela detecção de cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB). Portanto, segundo a WHO é importante priorizar uma ação focalizada no intuito de reduzir a incidência e o número de casos em 22 países, dentre os quais, o Brasil (WHO 2017). Segundo dados atualizados do Ministério da Saúde, foram relatados cerca de 66,7 mil casos em 2016 e cerca de 4,400 mortes em 2014 no Brasil (Ministério da Saúde 2016). Na tentativa de identificar fatores contextuais e individuais associados à incidência da tuberculose na população geral no Brasil foi relatado que o aglomerado doméstico é um provável alvo de intervenção. As taxas de incidência de AIDS, taxa de desemprego, coeficiente de Gini (desigualdade social), proporção de presos, renda familiar per capita e assistência à saúde básica foram correlacionados com o maior número de casos. Consequentemente, mitigar o impacto da pobreza e da desigualdade de renda no país, provavelmente, diminuiria o risco do desenvolvimento de tuberculose na população (Pelissari and Diaz-Quijano 2017).

A tuberculose é considerada uma doença da antiguidade. A interação patógeno hospedeiro tem se transcorrido por milhares de anos de coevolução, sendo difícil definir o início. Entre

diversas teorias, o bacilo provavelmente acompanhou a expansão da população mundial e a saída do homem moderno do continente africano, acompanhado por ondas de exploração, comércio e conquista (Gagneux 2012). Existem especulações teóricas de que *M. tuberculosis* ao longo da evolução desenvolveu estratégias com as quais manipula a resposta imunológica em benefício próprio. De maneira interessante, a relação com a baixa resposta inflamatória de macrófagos infectados por cepas primitivas como *M. africanum*, possivelmente, ressalta a baixa virulência e alta latência em seres humanos (de Jong et al. 2008). Classicamente, a infecção em seres humanos é o resultado de dois estados clinicamente definidos: a infecção latente ou a doença ativa. Indivíduos assintomáticos, latentes, apresentam a forma comedida e quiescente da doença. Entretanto, indivíduos com a doença ativa respondem vigorosamente aos antígenos micobacterianos, determinados pelo teste de tuberculina ou pelo ensaio de produção de IFN- γ . A presença dos sinais clínicos da doença podem ser extremamente variados, mas os mais comuns incluem tosse, perda de peso, febre e suores noturnos (Cadena, Fortune, and Flynn 2017).

A estrutura celular do bacilo é bem mais complexa do que a de outras bactérias Gram-positivas aeróbicas. Além da sua capacidade de multiplicação em ambientes com baixo teor de oxigênio, sua membrana celular é rica em lipídeos. Dentre todas as moléculas, as lipomananas e lipoarabinomananas possuem alta variabilidade química estrutural (Cole et al. 1998; Choudhary et al. 2018) e interagem com diferentes receptores do sistema imunológico, como os receptores do tipo Toll (*Toll-Like Receptors*) e as lectinas tipo-c (A. K. Mishra et al. 2011). Em termos simplificados, pode-se considerar que estes lipídios, proteínas e lipoglicanas fazem parte da sinalização de moléculas efetoras no processo da doença (Brennan 2003).

A infecção ocorre através da inalação de gotículas de aerossol contendo o bacilo expelido por pessoas infectadas e doentes, ou seja, com infecção ativa. A deposição dos bacilos nos alvéolos pulmonares é acompanhada pela infecção de células epiteliais (Castro-Garza et al. 2002), macrófagos alveolares (Schlesinger 1996) e células dendríticas (Henderson, Watkins, and Flynn 1997). Além disso, importantes barreiras e produtos antimicrobianos interferem no atual estado bacilar nos peridótos. Interessante salientar que não se sabe ao certo a dose de transmissão como também a condição do bacilo antes de ser inalado (Garton et al. 2008), embora seja descrito que um indivíduo doente pode causar a contaminação de 10 a 15 pessoas (P. L. Lin and Flynn 2010). Entretanto, já foi descrito que os fluidos presentes nos alvéolos contêm um arranjo de enzimas hidrolíticas que significativamente alteram a viabilidade do bacilo, clivando componentes da

parede celular e ativando neutrófilos (Yen 2016). Dessa forma, é possível inferir que o bacilo sofra o ataque de diversos peptídeos antimicrobianos como catelecidinas (LL37) e β -defensinas nas vias aéreas interferindo na infectividade (Arranz-Trullén et al. 2017).

A partir do estabelecimento dos bacilos no espaço alveolar, diversos leucócitos da imunidade inata, como as células T invariantes associadas à mucosa (*Mucosal associated invariante T cell* - MAIT) (Jiang et al. 2016; Gold et al. 2010), as células linfóides inatas (Steigler et al. 2018), as células $T\gamma\delta$, as células T *Natural Killer* invariantes (iNKT) que produzem GM-CSF (Rothchild et al. 2014) respondem rapidamente aos antígenos micobacterianos (Z. W. Chen 2013).

Eventos subsequentes direcionam a ativação de macrófagos alveolares residentes e o influxo de neutrófilos, que são recrutados para o sítio da infecção, por mecanismos dependentes de quimiocinas e citocinas (O'Garra et al. 2013). Consequentemente, o bacilo é reconhecido pelas principais famílias de receptores de superfície que compreendem os receptores do tipo Toll (*Toll-Like Receptors* - TLRs), receptores de lectina tipo-C e receptores *scavengers* (Stamm, Collins, and Shiloh 2015). A partir do momento que o bacilo é internalizado pelos macrófagos e neutrófilos, as sequências de eventos seguintes levam a fusão do fagossoma-lisossoma, recrutamento de potentes enzimas lisossomais hidrolíticas e à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através da enzima NADPH oxidase (NOX2) e, respectivamente, ativando a capacidade microbicida dessas células (Hmama et al. 2015). Entretanto, além das enzimas a cadeia transportadora de elétrons é também capaz de produzir formas reativas via receptores do tipo Nod (*NLRS-Nucleotide binding Oligomerization-Domain*) aumentando a capacidade microbicida dessas células (Koopman et al. 2010). Através do receptor mitocondrial do tipo NOD (NLRX1) as vias de NF- κ B e JNK são amplificadas induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (Tattoli et al. 2008).

Os macrófagos, principais sentinelas do espaço alveolar, quando reconhecem bacilos fagocitam-os e podem se diferenciar em macrófagos M1 em presença de GM-CSF, LPS, ácidos graxos, cristais de colesterol e IFN- γ produzindo citocinas pró-inflamatórias dentre elas IL-1 α/β , TNF- α , IL-12p40, IL-6 e quimiocinas (Labonte, Tosello-Tramont, and Hahn 2014; Woo et al. 2018). Os macrófagos M1 são essenciais para promover a morte do patógeno, uma vez que possuem como principal característica a produção de iNOS (óxido nítrico sintase) e, consequentemente, de NO, que é importante para a atividade microbicida do macrófago; porém, também estão envolvidos com o dano tecidual (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Do contrário,

os macrófagos ativados alternativamente ou macrófagos M2, em presença de IL-4 e IL-13 expressam mais arginase I e o receptor de manose, secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β e aumentam a produção de poliaminas, que auxiliam no reparo tecidual e prejudicam a resposta protetora e a eliminação dos bacilos (Redente et al. 2010). A IL-4 também inibe a secreção das citocinas IL-1 α , IL-18 e a autofagia, mecanismo comprovadamente associado à proteção na infecção experimental (Harris et al. 2009; Dittrich et al. 2008).

Os neutrófilos abundantes e circulantes são recrutados e quando ativados tem capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias como: IL-1 α/β , TNF, CXCL1/KC, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , GM-CSF e peptídeos antimicrobianos como catelicidinas e metaloproteinases (MMPs) (Mayadas, Cullere, and Lowell 2014). O papel do neutrófilo durante a infecção é contraditório. O recrutamento dessas células no início da infecção está associado com a resposta protetora. Entretanto, a neutrofilia é um marcador de prognóstico ruim e morbidade em seres humanos (Lowe et al. 2013). Como a tuberculose é uma doença crônica, que cursa com perpetuação da inflamação em decorrência da persistência dos antígenos micobacterianos, o recrutamento exacerbado de neutrófilos pode inverter o estado de controle do patógeno para um estado de imunopatologia (Lyadova 2017). Animais deficientes para Nos2 apresentam aumento na produção de IL-1 e consequentemente o intenso recrutamento de neutrófilos e maior dissiminação dos bacilos (B. B. Mishra et al. 2017). A principal importância dos neutrófilos durante o curso da doença é que essas células podem conter a dissiminação do bacilo, além de migrarem até os linfonodos e ativarem linfócitos e, principalmente, por recrutarem monócitos para o sítio da infecção através da produção de quimiocinas como: CCL2, CCL3, CCL19, CCL20, S100A8 e S100A9. Trabalhos atuais ressaltam que o bloqueio das moléculas S100A8 e S100A9 limitam a contenção do bacilo (Yoshioka et al. 2016).

Os monócitos quando recrutados dão aporte suficiente para conter o bacilo, expressam CCR2/CX3CR1, podendo ser classificados como inflamatórios quando expressam o marcador Ly6C high (Serbina et al. 2008). A proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) (também descrita como CCL2) é produzida por células mononucleares no início da infecção e interage com CCR2 (Sadek et al. 1998). Animais deficientes para CCR2, quando infectados, exibem defeito no recrutamento de macrófagos na fase inicial e recrutamento tardio de células dendríticas (Peters et al. 2004). Isso mostra que o receptor CCR2 é importante para o acúmulo de macrófagos e de células dendríticas nos pulmões de animais infectados. Estudos mais atuais mostraram que CCR2

não seria necessário para o recrutamento dos monócitos para o sítio da infecção e sim para a saída dos monócitos da medula óssea para o sangue. Além do mais, o receptor CCR2 e seu ligante CCL2 são importantes para a ativação de linfócitos T nos linfonodos (Samstein et al. 2013; Wolf et al. 2008). Todavia, se diferenciam em macrófagos e em células dendríticas no sítio da infecção, o que aumenta a atividade microbicida como também a ativação da resposta adaptativa (Liu, Liu, and Ge 2017).

Nesse momento é importante salientar que a ativação dessas células inatas consideradas como parte da primeira linha de defesa influencia na contenção e no *clearance* (eliminação) do bacilo. Já é sabido que uma resposta inata eficiente leva à contenção e à eliminação do patógeno, independente da ativação da resposta imune adaptativa (van Crevel, Ottenhoff, and van der Meer 2003). Entretanto, *M. tuberculosis* desenvolveu mecanismos de escape, que previnem a sua eliminação, como o bloqueio da acidificação do fagossoma e o bloqueio da fusão com o lisossoma por meio da secreção de macromoléculas, como fosfatases, lipídeos e proteínas (Philips 2008). A capacidade de impedir a formação do fagossoma é uma característica que é determinante para resposta imunológica. Dessa forma o acesso ao citosol oportuniza a replicação e disseminação do bacilo (Queval, Brosch, and Simeone 2017).

Além dos mediadores proteicos, como citocinas e quimiocinas, os mediadores lipídicos também participam na resposta ao bacilo. O balanço dos mediadores lipídicos nos macrófagos infectados exercem um papel determinante. Macrófagos deficientes para 5-lipoxygenase os quais não sintetizam LXA4, sofrem mais apoptose após infecção, enquanto macrófagos deficientes para prostaglandina E sintase, os quais não produzem PGE2 sofrem mais necrose por conseguinte extensa disseminação após infecção. *M. tuberculosis*, além de inibir a apoptose dos macrófagos, previne a apresentação cruzada de antígenos pelas células dendríticas, assim impedindo a resposta mediada por células T (M. Chen et al. 2008).

A partir do momento que o bacilo se estabelece no parênquima pulmonar, além dos fagócitos mononucleares, descritos anteriormente, as células dendríticas, especializadas na apresentação de antígenos, reconhecem o bacilo através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR, *Pathogen Recognition Receptors*), os quais interagem com os PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Ao tornarem-se ativadas, aumentam a produção de peptídeos microbianos, IL-1 α / β , IL-6 e quimiocinas como CCL3, CCL4, CXCL8, CXCL9 e o receptor CCR7. Os receptores que se destacam presentes nas células apresentadoras de antígenos e nos

macrófagos são os TLR2, TLR4, TLR9 e NOD sendo capazes de promover ativação da via de NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Divangahi et al. 2008).

As células dendríticas (DCs) compreendem uma população heterogênea de leucócitos com funções distintas que interligam a resposta inata com a adaptativa. Portanto, são extremamente importantes durante a infecção com *M. tuberculosis*. As diferentes populações de DCs expressam marcadores clássicos, como CD11c, MHCII, CD11b e CD103 (Dorhoi and Kaufmann 2015). As DCs, ao reconhecerem os bacilos, tornam-se ativadas e migram até os linfonodos drenantes, por influência das citocinas IL12p40 (Khader et al. 2006), IL12p70 e das quimiocinas CXCL19 e CXCL21, em torno de 8-12 dias após infecção (Cooper 2009). Trabalhos sugerem que a resposta adaptativa durante a infecção por *M. tuberculosis* apresenta um atraso devido modulação da adesão e migração das (DCs) pelo bacilo. DCs humanas infectadas exibem uma redução significativa da expressão de β 2 (CD18) integrina associada com a diminuição da expressão de CD11c e CD11b aumentando o período necessário para desencadear a resposta adaptativa (Roberts and Robinson 2013).

As DCs mais prevalentes nos pulmões e nos linfonodos são as que expressam CD11c^{high} e CD11b^{high} e quando cultivadas *in vitro* secretam IL-12p70, levando à diferenciação de uma resposta Th1 (Wolf et al. 2007). Essas populações mais prevalentes desencadeiam a resposta protetora dependente de MHCII, potencializando a secreção de IFN- γ pelos linfócitos o qual ativa a capacidade microbicida dos macrófagos e está correlacionado com proteção (Joanne L Flynn and Chan 2001). DCs infectadas produzem elevadas quantidades de IL-12p40 dependente da sinalização de TLR9, portanto animais deficientes para a produção de IL-12p40 apresentaram falta de controle durante a infecção e um pobre recrutamento de linfócitos, além de baixos níveis de IFN- γ (Bafica et al. 2005). Dentre as diversas populações de DCs, as células CD103⁺ chegam até o linfonodo em torno de 14 dias de infecção. Dados ressaltam que as células CD103⁺ são mais eficientes e tem um papel crucial na ativação da resposta adaptativa, ao passo que a partir que a infecção progride, as células CD11b⁺ são mais prevalentes (Koh et al. 2017). Trabalhos já demonstraram que as células CD103⁺ são envolvidas na migração da micobactéria para os linfonodos drenantes controlando o crescimento do bacilo através da indução de células T CD8⁺ (Lozza et al. 2014). Resultados do nosso grupo demonstram que a magnitude de produção de IFN- γ ou IL-17 por células CD4⁺ é dependente das células CD11c⁺ CD103⁺ e que esse padrão de resposta é diretamente associado com o *background* (conjunto de condições) genético (Sérgio et

al. 2015). Dados atuais destacam que as células CD103⁺ contra regulam as células CD11b⁺ diretamente produzindo IL-10 (Lai et al. 2018).

As células T quando ativadas nos linfonodos drenantes migram para o sítio da infecção após 14-17 dias. O atraso na indução da resposta adaptativa promove a replicação dos bacilos em até 40.000 mil vezes (Wolf et al. 2008). Isso mostra como a resposta imune celular é importante para o controle da infecção, ainda mais quando consideramos o caráter crônico dessa doença. Portanto, o conjunto de citocinas como IL-12 (Cooper et al. 1997), IL-1 (Jayaraman and Behar 2013), IL-6 (Ladel et al. 1997), TNF (J L Flynn et al. 1995) e IFN- γ (J L Flynn et al. 1993) estão associadas com a resolução e, dessa forma, proteção. Uma vez que a resposta Th1 é dependente de IL-12, mutações relacionadas a esse gene predispoem ao desenvolvimento de infecções micobacterianas (Wu et al. 1997).

As células T CD4⁺ do perfil Th1 produtoras de IFN- γ ativam funções microbidas dos macrófagos, juntamente com as células T CD8⁺, controlam a replicação intracelular de *M. tuberculosis* (Caruso et al. 1999; Scriba, Coussens, and Fletcher 2017). A produção de IFN- γ e de quimiocinas, como CCL5 (ou RANTES – *Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted*) e CXCL10 (ou IP-10 – *Inducible Protein-10*) facilitam o recrutamento das células CD4⁺ para o pulmão via CCR5 e CXCR3, respectivamente (Y.-J. Jung et al. 2009). O IFN- γ tem capacidade de promover mecanismos microbidas nos macrófagos através da maturação do fagossoma aumentando a sua acidificação induzindo a óxido nítrico sintase (NOS2) (Gutierrez et al. 2004; Schaible et al. 1998) e a autofagia a qual resulta no limitado controle do bacilo (Gutierrez et al. 2004). Além disso, as vias de transcrição JAK1 (*Janus Kinase 1*), fosforilação de STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) culminam ativadas via IFN- γ (Kristensen et al. 2011). Dessa forma, pacientes deficientes para a produção de IFN- γ (Fieschi et al. 2003) ou ainda com mutações nos genes IFN-gR1 ou IFN-gR2 sofrem de quadros graves da doença (Jouanguy et al. 1997) mesmo por cepas menos virulentas (Filipe-Santos et al. 2006).

A produção de IFN- γ é mais intensa no início da infecção, podendo ser modulada negativamente de acordo com a progressão da doença. Trabalhos do nosso grupo demonstraram que animais infectados com alta carga de *M. tuberculosis* assemelham-se com o padrão descrito em pacientes, exibindo uma baixa produção de IFN- γ acompanhado pelo aumento dos níveis de IL-4 (Morais Fonseca et al. 2010). Além disso, que a atividade da resposta supressora é influenciada pelo *background* genético do hospedeiro (Paula et al. 2011).

Além da indução da resposta Th1, DCs infectadas *in vitro* com *M. tuberculosis* produzem diversas citocinas, como IL-23, IL-1 α e IL-1 β , IL-6, TNF e IL-10, que contribuem para a diferenciação de diferentes populações de células T CD4⁺ (O'Garra et al. 2013). Estudos têm relatado que as células Th17, produtoras de IL-17, estão envolvidas na resposta protetora contra *M. tuberculosis* (Shen and Chen 2017). Linfócitos do padrão Th17/Th22 produzem citocinas como: IL-17A/IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-23. A diferenciação desse perfil de linfócitos é dependente de IL-6, TGF- β (*growth factor*- β), IL-1 β e sofrem expansão através de IL-23 via STAT3. Citocinas desse perfil são produzidas pelas células T CD4⁺, TCD8⁺, T $\gamma\delta$ e pelas células NK (natural killer) (Song et al. 2016). O papel protetor é devido principalmente ao efeito da IL-17 recrutar e ativar neutrófilos via CXCL1, CXCL5 (Lombard et al. 2016), facilitando o recrutamento de células Th1 via CXCL11, CXCL10 e CXCL9 (Khader et al. 2007) além de desencadear a produção de peptídeos anti-microbianos (Papotto, Ribot, and Silva-Santos 2017). Portanto, o bloqueio com anticorpos contra IL-17A e contra IL-17F aumentaram a suscetibilidade durante a infecção experimental (Segueni et al. 2016). Notavelmente, animais deficientes para IL-17 apresentam uma falha na formação do granuloma, enquanto a transferência de células T $\gamma\delta$ podem reconstituir o fenótipo (Okamoto Yoshida et al. 2010). Por outro lado, estudos também já mostraram que o aumento de células duplo produtoras de IFN- γ e IL-17 no sangue periférico de pacientes foi correlacionado com a severidade da doença. Ao contrário, vários estudos tem demonstrado que a ausência de um controle na estimulação pode designar uma inflamação exagerada mediada por neutrófilos e monócitos inflamatórios causando lesão tecidual (Auffray, Sieweke, and Geissmann 2009; Nathan 2006).

Apesar da resposta inflamatória intensa e a presença de células Th1 produtoras de IFN- γ , induzidas pela presença dos bacilos, indivíduos suscetíveis à doença ativam e estimulam a diferenciação de células do perfil Th2 e células T reguladoras (Treg). Dessa forma, IL-4, IL-10 e TGF- β estão associadas com a progressão da doença (Hernandez-Pando, Orozco, and Aguilar 2009; Morais Fonseca et al. 2010; Redford, Murray, and O'Garra 2011). Infecções parasitárias desenvolvem um perfil Th2, podendo contrabalancear a resposta Th1 (Chukwuanukwu et al. 2016). Trabalhos têm demonstrado que além da condição do sistema imunológico do hospedeiro o próprio bacilo pode desencadear uma resposta Th2. Animais infectados com a cepa *M. smegmatis* expressando a proteína MS1987 promoveram uma resposta do perfil Th2 com baixa produção de IFN- γ e alta produção de IL-4 (Sha et al. 2017).

Em síntese, diferentes populações de células $CD4^+$ (Th1, Th2, Treg e Th17), células $CD8^+$ específicas para antígenos e células B são ativadas durante a infecção. Conforme a infecção progride, frequentemente a produção de $IFN-\gamma$ diminui enquanto a população de células T reguladoras aumenta (Parkash, Agrawal, and Madhan Kumar 2015). Ainda assim, os pacientes exibem acentuada resposta inflamatória, definida como reação de hipersensibilidade do tipo IV, caracterizando a TB ativa nos pacientes imunocompetentes como uma doença imuno-mediada. Uma das consequências dessa resposta de hipersensibilidade do tipo IV nas doenças crônicas, como a tuberculose, é a formação do granuloma (Scriba, Coussens, and Fletcher 2017).

O papel do TNF, produzido pelos fagócitos mononucleares, tem sido descrito como essencial durante a formação do granuloma (J L Flynn et al. 1995), ou seja, animais deficientes para TNF apresentaram falha na formação desse arranjo celular (Keane et al. 2001). A estrutura do granuloma é caracterizada por um centro necrótico, chamado de caseoso, circundado por diversos macrófagos seguidos de linfócitos T e B e mais externamente por uma cápsula fibrótica (Russell et al. 2009; J L Flynn, Chan, and Lin 2011), além da presença de neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos (P. L. Lin et al. 2014). Seu papel tem sido descrito como limitante de contenção e eliminação do bacilo; entretanto, pode servir como reserva constante de transmissão do patógeno, já que ao tornar o patógeno menos exposto, retarda a resposta protetora, podendo se tornar uma fonte de dissiminação do patógeno (Davis and Ramakrishnan 2009; Shaler et al. 2013).

Em suma, a resposta imunológica contra o bacilo *M. tuberculosis* ainda não é claramente compreendida apesar de dois séculos do descobrimento do agente causador da doença. O grande paradigma da resposta imune durante a tuberculose é que uma baixa resposta Th1 pode resultar numa resposta imunológica ineficiente na eliminação dos bacilos, enquanto a inflamação excessiva, mediada pela mesma resposta Th1 protetora e, possivelmente, pela resposta Th17, se não forem controladas, resultam em uma patologia grave com perda da função pulmonar (Scriba, Coussens, and Fletcher 2017). Diversos fatores já estabelecidos como o alcoolismo, tabagismo e a nutrição podem interferir nesse contexto. Trabalhos atuais têm destacado a influência de fatores de risco mais proeminentes na saúde da sociedade moderna, como a obesidade e diabetes. A diabetes, que está associada com obesidade, aumenta em três vezes a chance de desenvolver tuberculose (Kumar Nathella and Babu 2017).

1.2. Obesidade, metainflamação e resposta imunológica

O corpo humano não está adaptado a exposições constantes a dietas calóricas nem ao ambiente sedentário (Karlsson and Beck 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (*WHO, World Health Organization*), o número de pessoas obesas triplicou desde 1975 e dados mundiais, referentes a 2016, ressaltam que pelo menos 1,9 bilhões de adultos estão acima do peso e desses 650 milhões são obesos (WHO 2018). A obesidade é definida através do índice de massa corpórea elevado (IMC; $\geq 30 \text{ kg/m}^2$), exibindo deposição extensiva do tecido adiposo (Solana et al. 2018). Previamente associada a países de alta renda, atualmente, a obesidade também é constatada em países de baixa e média renda (WHO 2018). Estudo recente apontou que em 2015 mais de 4 milhões de pessoas morreram de doenças associadas à obesidade globalmente (Global Burden of Disease 2017). Baseando-se nesse cenário, a estimativa é de que mais de 50% da população mundial será classificada com sobrepeso ou obesa até 2030 (United Nations 2015).

O Brasil, que luta ainda contra a fome e a desnutrição, segue os indicativos mundiais, e está também com grande parte da população no quadro de sobrepeso. O aumento de peso dos brasileiros está relacionado com fatores econômicos e culturais, mas também genéticos e hormonais (BBC Brasil 2017). De acordo com dados publicados pelo Ministério da Saúde, de 2006 a 2016, a prevalência da obesidade aumentou em 60% passando de 11,8% para 18,9% (Ministério da Saúde 2017). A sociedade moderna, inclusive a brasileira, tem adotado um padrão alimentar chamado de *Western diet*, o qual é caracterizado pelo consumo de alimentos ricos em gorduras, carboidrato e, especialmente, açúcares (Vandevijvere et al. 2015).

Nos mamíferos, o tecido adiposo pode ser classificado em dois tipos: o tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom. Enquanto o tecido adiposo branco é fonte de energia, o tecido marrom é encontrado predominantemente em neonatos e é importante para a regulação da temperatura corpórea. Além dos adipócitos, a célula mais abundante no tecido, existem também pre-adipócitos, os quais são células que ainda não sofreram hipertrofia, células endoteliais, fibroblastos, leucócitos, dentre os quais, os macrófagos (Tilg and Moschen 2006).

O tecido adiposo hiperplásico de indivíduos obesos caracteriza-se por baixo grau de inflamação crônica e sistêmica, denominada metainflamação (Gökhan S. Hotamisligil 2017). Estudos têm reportado que a inflamação induzida pela obesidade está correlacionada com a maior expressão de genes associados aos macrófagos M1 e menor expressão de genes relacionados com macrófagos M2 no tecido adiposo (Fujisaka et al. 2009; Strissel et al. 2010; Zeyda et al. 2007;

Lumeng, Bodzin, and Saltiel 2007; Wentworth et al. 2010). Normalmente, os macrófagos M2 por produzirem IL-10 e o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1RA), são associados com a homeostasia metabólica e massa corporal magra. Em contrapartida, os macrófagos M1 estão associados com aumento da inflamação no tecido adiposo, por induzirem a produção de elevadas concentrações de TNF, IL-6 e IL-1 β (Sharma, Akkoyunlu, and Rabin 2017).

Indivíduos obesos são mais suscetíveis à pneumonia, aos abscessos e às infecções da pele, ressaltando que a relação de risco é diretamente proporcional: quanto mais peso, maior é o risco de infecções (Kaspersen et al. 2015; Madan and Petri 2015). Dessa forma, trabalhos já tem constatado a influência em diversas infecções patogênicas como por *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* entre outras (Sellayah, Cagampang, and Cox 2014).

A obesidade também está associada com efeitos metabólicos adversos, como aumento da pressão arterial, colesterol, triglicerídeos e resistência à insulina (Lachmandas et al. 2016). Consequentemente, esses fatores aumentam o risco de desenvolver doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral isquêmico e diabetes do tipo 2 . Além disso, também já está descrito que o aumento do índice de massa corpórea (IMC) leva ao risco de câncer de bexiga, mama, cólon, próstata, endométrio, rim e vesícula biliar (Solana et al. 2018).

Os eventos iniciais relacionados à obesidade ainda não são totalmente esclarecidos, mas estudos mostram que a perda da homeostasia tecidual induzida pela hipertrofia dos adipócitos induz um estado de micro-hipóxia tecidual (Ye et al. 2007; Petrangeli et al. 2016) reduzindo o acesso à matriz extracelular (Spencer et al. 2011). Como resultado, os adipócitos secretam leptina, MCP-1, IL-6, IL-1 β e TNF ativando macrófagos residentes para um perfil M1. O aumento do *input* calórico leva ao estresse no retículo endoplasmático (Ozcan et al. 2004; Houstis, Rosen, and Lander 2006) e eventual lise dos adipócitos, resultando no aumento de marcadores inflamatórios exógenos e endógenos (G S Hotamisligil 2006). Além disso, a lipólise é fonte de ácidos graxos que também ativam os macrófagos M1 via TLR2 (Ahmad et al. 2012), TLR4 (H. Shi et al. 2006), TLR10 (Sindhu et al. 2018), NLRP3 (Han and Levings 2013) e Nod (Pavillard et al. 2018).

Os macrófagos recrutados para o local fagocitam os adipócitos que estão necrosados ou seus restos celulares formando estruturas denominadas “*crown-like structures*”, caracterizadas morfológicamente como um anel de macrófagos circundando os adipócitos (Cucak, Grunnet, and Rosendahl 2014). O estado de ativação e recrutamento desses macrófagos é dependente da sinalização do receptor CCR2, pois camundongos deficientes para CCR2 apresentaram redução

do perfil pró-inflamatório no tecido adiposo (Weisberg et al. 2006). Todavia, a participação de órgãos distantes, como o intestino, pode também fazer parte da indução da metainflamação. A dieta rica em lipídeos (*High Fat Diet – HFD*) altera a composição da microbiota, causando disbiose (He et al. 2018). Isso compromete a barreira epitelial do intestino, resulta em liberação de LPS e outros produtos microbianos aumentando a inflamação (Caesar et al. 2012).

Além disso, o estresse metabólico afeta o microambiente da medula óssea. Animais alimentados com HFD apresentaram redução da população de células $\text{Lin}^- \text{Sca}^+$ e consequentemente pobre reconstituição das células tronco hematopoiéticas. Pode-se considerar que ocorre uma estagnação no ambiente medular (Luo et al. 2015). Evidências recentes têm relacionado também a disbiose e a disfunção da barreira epitelial com a diferenciação de populações de células Th1, Th17 e Treg (McPhee and Schertzer 2015). Entretanto, não é plenamente compreendido quais comunidades microbianas estariam correlacionadas com o desenvolvimento da obesidade e suas consequências (Dahiya et al. 2017; J. C. Lee et al. 2017).

Além dos macrófagos, outras células como as células NK (*Natural Killer*) (Wensveen et al. 2015), células T CD8^+ (Nishimura et al. 2009), células T reguladoras (Feuerer et al. 2009), células B (Winer et al. 2011) e até mastócitos (Żelechowska et al. 2018) participam da metainflamação. Os eventos subsequentes levam ao aumento da produção de $\text{IFN-}\gamma$, promovendo a diferenciação e também a ativação de macrófagos M1 no tecido adiposo, caracterizando-os como os mais abundantes (Borst 2004; Patsouris et al. 2008; Wensveen et al. 2015).

Essa rede de eventos contribui diretamente com as consequências metabólicas da obesidade, como a intolerância à glicose e o desenvolvimento da resistência à insulina (Czech 2017). Estudo pioneiro realizado por Hotamisligil e colaboradores apontou as primeiras conexões da metainflamação com a diabetes do tipo 2. Modelos experimentais de obesidade apresentaram o aumento da expressão de TNF de forma sistêmica. Quando o TNF foi neutralizado por meio de anticorpos que bloqueavam sua função, houve redução na resistência à insulina (G S Hotamisligil, Shargill, and Spiegelman 1993). A partir desse estudo, foi demonstrado que sinais inflamatórios derivados da metainflamação perturbam a sinalização da insulina. Portanto, as citocinas pró-inflamatórias elevadas sistemicamente ativam diversas quinases, óxido nítrico sintase, tirosina fosfatases e sinais extracelulares (Khodabandehloo et al. 2016). Essas diversas enzimas e fatores quando ativados prejudicam a expressão do receptor da insulina na superfície das células dos tecidos alvos e por consequência a sua sinalização (Czech 2017).

A obesidade também afeta os pulmões. Trabalhos tem destacado os efeitos na resolução como também no risco de desenvolvimento de infecções do trato respiratório superior (Huttunen and Syrjänen 2012). Um hormônio importante na regulação do metabolismo energético é a leptina, a qual sofre alteração no contexto da obesidade. Animais alimentados com HFD ou deficientes para o receptor da leptina são mais susceptíveis à infecção pelo vírus influenza e apresentam patologia pulmonar aumentada quando comparado com animais magros. Trabalhos têm apontado redução da citotoxicidade das células NK (Smith et al. 2007), produção reduzida de IFN α/β (Radigan et al. 2014) além de redução da população de macrófagos alveolares e de células T reguladoras (Milner et al. 2015) ressaltando que a obesidade dificulta a habilidade do sistema imunológico em responder a infecções. Além disso, foram observadas alterações no metaboloma dos animais obesos infectados com o vírus. As vias dos ácidos graxos, fosfolipídeos e o metabolismo de nucleotídeos nos pulmões desses animais foram alterados agravando a infecção, evidenciando que a obesidade induz distintas respostas aberrantes (Radigan et al. 2014). Revisões atualizadas apontam que a obesidade prejudica a resposta imunológica durante as infecções virais, evidenciado pelo elevado número de casos entre pacientes obesos durante a pandemia de 2009 (Louie et al. 2011) e também a baixa resposta protetora a vacinação contra o vírus (Green and Beck 2017).

A pneumonia também é mais incidente e prevalente em pacientes obesos ou diabéticos (Fisher-Hoch, Mathews, and McCormick 2013). Os mecanismos associados ainda não são bem definidos, mas animais deficientes para leptina e infectados por *Streptococcus pneumoniae* evidenciam aumento da carga bacteriana no pulmão e baço. Ensaios com macrófagos alveolares provenientes desses animais apresentaram fagocitose e capacidade microbicida reduzidas (Mancuso et al. 2018).

Em relação à tuberculose, foi descrito que o risco de desenvolvimento da doença em pacientes obesos era reduzido (Leung et al. 2007), ou seja, quanto maior o índice de massa corpórea, menor o risco (Lönnroth et al. 2010), sendo o baixo peso relacionado com aumento da incidência (Yen 2016). Entretanto, o sobrepeso é um fator importante para o desenvolvimento do diabetes, por conseguinte, é fator de risco para a tuberculose. A partir de uma meta análise de 13 estudos foi possível salientar que indivíduos diabéticos apresentavam três vezes mais risco de desenvolver tuberculose em comparação com indivíduos sem a doença (Jeon and Murray 2008). Em relação ao Brasil, os casos de diabetes e tuberculose aumentaram de 380 casos para 6.150 entre 2001 e 2011 (Reis-Santos et al. 2014). A associação inversa que se apresenta cria um paradoxo, ou seja, a obesidade, que parece ser inversamente relacionada com a incidência de tuberculose, é fator

fortemente associado ao desenvolvimento da diabetes, que representa um fator de risco para a tuberculose (H.-H. Lin et al. 2018).

1.3. IL-1 α / β e IL-1R

A interleucina 1 (IL-1) é um mediador central da imunidade inata e da inflamação. Mesmo antes da sua identificação, em 1980, essa citocina foi mencionada em diversos estudos como mediador endógeno de leucócito, hematopoetina 1, pirógeno endógeno, catabolina e fator ativador de osteoclasto (Sims and Smith 2010). A sua participação e função foi validada em diversos processos imunológicos e em doenças autoimunes, degenerativas e infecciosas (Garlanda, Dinarello, and Mantovani 2013). Dentre as diversas funções no sistema imunológico, a IL-1 é essencial durante o recrutamento de macrófagos e neutrófilos nos processos inflamatórios (Rider et al. 2011), na polarização e ativação de linfócitos (Sutton et al. 2006; Foucher et al. 2015), na indução de defensinas (Pioli et al. 2006) e na produção de óxido nítrico (Thomas et al. 2002). Além disso, as citocinas que fazem parte da família da IL-1 desempenham um papel fundamental na diferenciação e função das células linfóides e mielóides (Joosten, Netea, and Dinarello 2013). Fazem parte da família da IL-1, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ) que são agonistas do receptor IL-1R1. Também fazem parte do grupo os três receptores antagonistas: IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38 e a citocina anti-inflamatória IL-37 (Garlanda, Dinarello, and Mantovani 2013).

Os monócitos, fibroblastos, células dendríticas, linfócitos B, células NK e células epiteliais produzem IL-1 α e IL-1 β . Essas citocinas aumentam a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, ativando a transmigração de fagócitos e linfócitos para os locais de infecção. Além disso, a IL-1 também afeta a atividade do hipotálamo, leva ao aumento da temperatura corporal provocando hiperalgesia, aumento da sensibilidade à dor, vasodilatação e hipotensão (Schett, Dayer, and Manger 2016).

As isoformas IL-1 α e IL-1 β são transcritas por ribossomos associados ao citoesqueleto nas formas precursoras de 31 e 35 kDa, respectivamente, e apresentam apenas 26% de homologia na sequência de aminonoácidos (Nicklin et al. 2002; Taylor et al. 2002). A IL-1 α é mais proeminente no intestino, pulmões, baço e fígado, enquanto a IL-1 β é mais evidente no coração, cérebro, músculo esquelético e rins (Hacham et al. 2002).

Os sinais que levam à transcrição da IL-1 β incluem a sinalização via TLRs e a estimulação por TNF (Garlanda, Dinarello, and Mantovani 2013). Os componentes microbianos ou sinais de estresse induzem a síntese da pró-forma da IL-1 β , que se torna ativa, por meio da clivagem proteolítica pela caspase 1 (Thornberry et al. 1992). A ativação da caspase 1 é mediada pela formação de uma plataforma molecular denominada inflamassoma, constituída por NLR (Nod-like receptors) e pela molécula adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD).

A IL-1 α é produzida continuamente pela grande maioria das células e tecidos, como em camadas epiteliais do trato gastrointestinal, pulmão, fígado e rim, atuando como uma alarmina. Sua ação é dependente da clivagem pela enzima calpaína, cisteína protease sensível ao influxo de cálcio nos compartimentos intracelulares (Watanabe and Kobayashi 1994). Sua secreção é descrita durante a morte celular induzida por necrose associada a mecanismos de inflamação estéril (Berda-Haddad et al. 2011). Além disso, é descrita como marcador de senescência das células do sistema imunológico (Ong et al. 2018; Orjalo et al. 2009).

A sinalização da IL-1 α e IL-1 β é iniciada através da interação com o receptor IL-1R1, seguida do recrutamento da proteína acessória IL-1RAcP. A interação homofílica entre os domínios TIR possibilita o recrutamento da proteína adaptadora MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) que em seguida, desencadeia uma resposta típica envolvendo os fatores de transcrição como NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), AP1 (Activator protein 1) e MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*). A ativação desses fatores culminam na produção de citocinas pró-inflamatórias (O'Neill and Greene 1998).

Embora sinalizem via IL-1R, IL-1 α e IL-1 β podem exercer funções diferentes (Di Paolo and Shayakhmetov 2016). A IL-1 α desempenha papel importante durante a formação do granuloma. No modelo induzido por sílica foi observado que animais deficientes para IL-1 α , mas não para IL-1 β , apresentaram poucos granulomas associado com a redução de células CD11b high . Seu papel também foi evidenciado nas respostas adaptativas, IL-1 α associada à membrana e expressa de forma constitutiva por macrófagos promove a diferenciação de células Th17 (Foucher et al. 2015). No modelo translacional de corioamnionite, inflamação das membranas fetais (âmnio e córion), a administração de IL-1 α nos pulmões, intestino ou pele culminou no aumento do número de leucócitos, como as células CD3 $^{+}$. Além do mais a exposição direta no intestino comprometeu a

expressão das ocludinas (ZO-1), induziu atrofia das vilosidades além de aumentar os níveis de expressão para CD68, IL-1 e TNF- α (Nikiforou et al. 2016).

Estudos demonstram que a IL-1 α está associada a alterações no metabolismo, embora os mecanismos não estejam ainda elucidados. Crianças com diabetes do tipo 1 e elevada hiperglicemia apresentavam aumento de IL-1 α , IL-4 e IL-6 persistindo por horas, independente da regulação da glicose no sangue (Rosa et al. 2008). Em jovens com sobrepeso, a produção de IL-1 α não foi correlacionada com o índice de massa corporal e sim com as concentrações de triglicerídeos, colesterol total e colesterol de baixa densidade (LDL) (C. Jung et al. 2010). Observações a partir de modelos experimentais mostraram que animais obesos apresentaram IL-1 α aumentada no soro e, surpreendentemente, esses animais apresentaram aumento dos níveis de triglicerídeos no sangue 12 horas após a administração de IL-1 α recombinante. Assim, a IL-1 α participa de mecanismos que alteram o metabolismo, mas tais mecanismos ainda não foram plenamente esclarecidos (Um et al. 2011). Durante a obesidade, os adipócitos sofrem hipóxia e necrose, tornando-se um sinal de perigo e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Portanto, os lipídeos armazenados por essas células são dispersos sistemicamente. Os ácidos graxos dispersos sistemicamente foram capazes de promover exclusivamente a liberação de IL-1 α *in vitro*, sem ter capacidade de induzir a produção de IL-1 β , quando adicionado na cultura de macrófagos primados com LPS. Além disso, células do sangue periférico na presença de ácido oleico, linoleico ou araquidônico produziram exclusivamente IL-1 α (Freigang et al. 2013). Sistemicamente, a IL-1 α participa da lipoatrofia e da regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias por ADSCs (*adipose-derived mesenchymal stem cells*) inibindo a proliferação e a diferenciação das ADSCs. Entretanto, células diferenciadas em contato com a IL-1 α apresentaram aumento na produção de IL-8, IL-6, CCL2 e IL-1 β (Sun et al. 2017).

Enquanto o papel da IL-1 α ainda necessita ser melhor investigado na inflamação induzida pela obesidade, o papel da IL-1 β está bem definido. Camundongos deficientes para a expressão do receptor de IL-1 (IL-1R^{-/-}), alimentados com HFD, apresentaram redução da inflamação no tecido adiposo e na expressão de TNF e IL-6 quando comparados aos animais WT (*Wild Type*) também alimentados com HFD (McGillicuddy et al., 2011). Especificamente, a plataforma de NLRP3 é um importante sensor que induz a produção de IL-1 β durante a obesidade. Essa plataforma molecular tem capacidade de ser sensível a ceramidas induzindo a ativação da caspase 1 em macrófagos no tecido adiposo. Dessa forma, a ausência de NLRP3 em animais previne o

desenvolvimento da metainflamação e, conseqüentemente, aumenta a sensibilidade à insulina (Vandanmagsar et al. 2011).

No sistema imunológico de animais ou indivíduos obesos, a produção de IL-1 β altera a capacidade pulmonar. Animais obesos desenvolvem hiper-reatividade dependente da produção de IL-17 via ILC3 (*Type 3 Innate Lymphoid Cells*) e do inflamassoma NLRP3. Os macrófagos produtores de IL-1 β induzidos pela dieta tiveram capacidade de expandir as células ILC3 produtoras de IL-17. Esse efeito foi abolido quando a IL-1 β foi bloqueada (Kim et al. 2014). Baseado no grande número de estudos, o bloqueio da atividade de IL-1 β tem reduzido a gravidade de doenças inflamatórias. A terapia anti-inflamatória baseada no bloqueio da IL-1 β foi comprovada ser efetiva durante o tratamento da aterosclerose (Ridker et al. 2017). Portanto, tanto o bloqueio pró-inflamatório ou aumento (endógeno) de citocinas anti-inflamatórias que são membros da família da IL-1, podem frear os avanços do desenvolvimento da síndrome metabólica e a resistência à insulina (Ballak et al. 2015).

Como mencionado anteriormente, ambas as citocinas, IL-1 α e IL-1 β conferem proteção contra tuberculose (Scriba, Coussens, and Fletcher 2017). O primeiro estudo que avaliou o papel da IL-1 na TB experimental mostrou que animais deficientes para o receptor IL-1R sucumbiram à infecção por *M. tuberculosis* e apresentaram menor produção de IFN- γ por células do baço quando comparados aos animais (WT) infectados (Juffermans et al. 2000). Posteriormente, camundongos deficientes para a expressão tanto de IL-1 α como IL-1 β desenvolveram significativamente maiores lesões granulomatosas não necróticas nos pulmões comparados aos camundongos (WT) infectados. Além disso, a produção de NO a partir da cultura de macrófagos alveolares de camundongos deficientes para IL-1 α/β foi menor comparado com camundongos WT, mas os níveis foram reestabelecidos quando adicionada IL-1 α/β recombinante na cultura. A partir desses resultados foi claramente demonstrado que IL-1 α/β são importantes para a geração de imunidade protetora na fase precoce da infecção pelo bacilo (Yamada et al. 2000).

O reconhecimento de *M. tuberculosis* por células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) e macrófagos alveolares através de TLR2 / TLR6 e NOD2 leva à transcrição da pro-IL-1 β por vias que envolvem Erk, p38 e RIP2 (Kleinnijenhuis et al. 2009). Para investigar a contribuição dos TLR nas vias que induzem a produção de IL-1 α/β , camundongos deficientes para MyD88, TRIF/MyD88, IL-1R1, e IL-1 β foram infectados com *M. tuberculosis*. Todas as quatro linhagens exibiram mortalidade aguda, com grande aumento da carga bacteriana pulmonar,

sugerindo papel importante para a sinalização de IL-1 β (Fremond et al. 2007). De modo semelhante, os animais deficientes para caspase-1 e ASC também foram suscetíveis. Juntos, esses resultados revelaram o papel importante da IL-1 β na resistência do hospedeiro sendo capaz de ser produzida por mecanismos que não necessariamente dependem da sinalização de TLR ou caspase-1 (K. D. Mayer-Barber et al. 2010). Monócitos, macrófagos e células dendríticas co-expressam as duas isoformas da IL-1 durante a infecção pelos bacilos (Katrin D. Mayer-Barber et al. 2011). Durante uma infecção crônica, camundongos que receberam anticorpos somente para IL-1 α demonstraram aumento da suscetibilidade. Apesar de não ter sido avaliado a produção de células da resposta adaptativa, o trabalho sugere que a IL-1 α estaria correlacionada com a resposta inata e a sinalização do receptor IL-1R (Guler et al. 2011). Somado a isso, IL-1 α/β conferem resistência durante a infecção através da indução da produção de eicosanoides limitando a produção excessiva de interferon do tipo 1 (Katrin D Mayer-Barber et al. 2014a). Trabalhos recentes demonstraram que a produção de óxido nítrico pelos leucócitos em resposta ao IFN- γ também inibe a produção de IL-1 β . Esse efeito foi devido a capacidade do óxido nítrico inibir a plataforma do inflamassoma de NLRP3 através da nitrosilação (B. B. Mishra 2013). Por fim, camundongos deficientes para a expressão de óxido nítrico sintase apresentaram um aumento da produção de IL-1 β consequentemente recrutamento de neutrófilos promovendo a replicação do bacilo correlacionado com o aumento de lesões caseosas em pacientes com tuberculose (B. B. Mishra et al. 2017). Todavia, IL-1 α/β talvez poderiam ter um papel nocivo em condições que ainda não foram plenamente desvendadas como na comorbidade obesidade e TB.

2. JUSTIFICATIVA

Resultados prévios de nosso grupo mostram que animais obesos, em decorrência da ingestão de dieta hiperlipídica (HFD, *High Fat Diet*), infectados com *M. tuberculosis* são mais suscetíveis e apresentam inflamação pulmonar mais intensa quando comparados aos animais não obesos, alimentados com dieta padrão (LFD, *Low Fat Diet*) e infectados. A análise através PCR *microarray* dos pulmões desses animais evidenciou o aumento na expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α e IL-1 β , sendo a IL-1 β importante na metainflamação induzida pela obesidade. Somado a isso, os animais quando obesos apresentam aumento de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17. Dessa forma, os resultados de nosso grupo confirmam dados de estudos clínicos com amostras de pacientes portadores da comorbidade diabetes e tuberculose. Esses pacientes apresentam exacerbação da resposta adaptativa na condição de comorbidade comparada aos pacientes com tuberculose, que não têm diabetes (Stevenson et al. 2007; Raposo-García et al. 2017; Restrepo 2016). Pacientes com diabetes do tipo 2 desenvolvem a doença ativa caracterizada pelo aumento da cavitação e, conseqüentemente, transmissão, ressaltando a relação de risco (Jeon and Murray 2008). Esse cenário tem sido evidenciado no Brasil. Gil-Santana e colaboradores já evidenciaram em um estudo de coorte que pacientes diabéticos apresentaram quadros clínicos mais graves de cavitação (Gil-Santana et al. 2016).

A obesidade está diretamente associada com a diabetes tipo 2, e com a indução de inflamação caracterizada pelo acúmulo de macrófagos M1, CCL2, IL-1 β , IL-6 juntamente com a hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo (Gökhan S. Hotamisligil 2017). Sabendo que as citocinas IL-1 α/β são importantes para a resposta protetora na infecção por *M. tuberculosis*, que a IL-1 β está relacionada com a metainflamação que ocorre na obesidade, e sabendo que camundongos obesos e infectados por *M. tuberculosis* são mais suscetíveis e apresentam maior inflamação pulmonar que os animais magros e infectados, nossa proposta de estudo foi investigar o eixo IL-1/IL-1R na progressão da infecção e na inflamação pulmonar na interface obesidade e tuberculose. Estudos já tem apontado o efeito deletério da IL-1 β em diversas doenças inflamatórias (Lachmann et al. 2009; Ruperto et al. 2012; Ridker et al. 2012; Ridker 2017), enquanto a IL-1 α ainda é pouco explorada, principalmente o seu possível papel como reguladora do metabolismo e, conseqüentemente, da resposta imunológica.

É importante ressaltar que há apenas um único estudo na literatura relacionando tuberculose e obesidade. Tal estudo foi realizado empregando camundongos deficientes para leptina (ob/ob),

que quando infectados com *M. tuberculosis* foram mais suscetíveis e produziram menos IFN- γ que os animais WT infectados (Wieland et al. 2005).

Desse modo, nossa hipótese era que o aumento da inflamação pulmonar, como consequência da obesidade, acentua a susceptibilidade e a progressão da infecção, sendo tanto a IL-1 β como a IL-1 α mediadores determinantes nesse processo. Para isso, nossa ferramenta foi a utilização de animais deficientes para IL-1 α ou para o receptor de IL-1 (IL-1R), alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) ou dieta padrão (LFD), seguida da infecção com *M. tuberculosis*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar se o aumento na magnitude da inflamação pulmonar e a progressão da infecção por *M. tuberculosis*, em decorrência da obesidade, poderiam ser atribuídos ao eixo IL-1/IL-1R.

3.2. Objetivos Específicos

Utilizando como ferramenta animais deficientes para a expressão do receptor para IL-1 (IL-1R^{-/-}) e animais deficientes para a expressão de IL-1 α (IL-1 α ^{-/-}):

3.2.1. Avaliar a susceptibilidade/progressão à infecção por *M. tuberculosis* dos animais IL-1 α ^{-/-} e IL-1R^{-/-} obesos comparando aos animais IL-1 α ^{-/-} e IL-1R^{-/-} não obesos e aos animais WT obesos.

Nos animais obesos e não obesos, infectados:

3.2.2. Realizar a análise histopatológica do pulmão e tecido adiposo.

3.2.3. Avaliar as populações de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-17 nos pulmões

3.2.4. Quantificar as populações de neutrófilos, monócitos, macrófagos e subpopulações de células dendríticas nos pulmões.

3.2.5. Quantificar as citocinas em homogenatos de pulmões.

3.2.6. Confirmar o papel da IL-1 α e da IL-1 β na interface da obesidade e tuberculose por meio do tratamento de animais obesos com IL-1 α recombinante ou com anticorpo monoclonal contra IL-1 β .

3.2.7. Investigar o papel dos macrófagos e das células dendríticas na indução da resposta inflamatória e ativação de células CD4⁺, respectivamente, em decorrência da obesidade ou da expressão de IL-1 α .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos selvagens fêmeas, 6 semanas de idade do background genético C57BL/6 (*Wild Type* -WT) e deficientes para o receptor da IL-1 (*IL-1R^{-/-}*) e IL-1 α (*IL-1 α ^{-/-}*) foram sedidos pelo Biotério de Animais Isogênicos e pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos durante os experimentos dentro de micro isoladores no laboratório de nível II e III de biossegurança, adequado para a manipulação de animais infectados, com livre acesso à água e a pelo menos 5g diárias de dieta. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (Protocolo nº91/2017, ANEXO 1).

4.2. Grupos de animais

Para cada experimento, quatro (04) grupos, com cinco (05) animais por grupo foram avaliados.

GRUPO I WT Não obeso infectado	GRUPO II IL-1R ^{-/-} Não obeso infectado	GRUPO III WT Obeso infectado	GRUPO IV IL-1R ^{-/-} Obeso infectado
GRUPO I WT Não obeso infectado	GRUPO II IL-1 α ^{-/-} Não obeso infectado	GRUPO III WT Obeso infectado	GRUPO IV IL-1 α ^{-/-} Obeso infectado

4.3. Dieta dos animais

Camundongos C57BL/6, *IL-1R^{-/-}* e *IL-1 α ^{-/-}* foram mantidos em dieta purificada AIN-93G (NUVILAB®) descrito anteriormente por Reeves e colaboradores (Reeves, Nielsen, and Fahey 1993) modificada para hiperlipídica (35% de lipídios, sendo 4% de origem vegetal (óleo de soja Sadia®) e 31% de origem animal (gordura suína Sadia®) – *High Fat Diet*- HFD) ou com dieta comercial padrão durante o período de onze semanas (**Tabela 1**).

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

Tabela 1. Ingredientes para LFD e HFD.

4.4. Preparo do inóculo de *M. tuberculosis*

O preparo do inóculo de *M. tuberculosis* (Mtb) H37Rv (ATCC 27294) foi realizado conforme metodologia descrita por Fonseca 2009 (da Fonseca, Silva et al. 2009). Foi utilizada uma alíquota de Mtb congelada à -80°C (com viabilidade superior à 85%), esta alíquota em volume total de 2,5mL de meio Middlebrook 7H9 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) adicionado de 10% de OADC™ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) foi incubada por 8 dias a 37°C. Entre os dias 7 e 10 a suspensão bacteriana foi centrifugada, retirada o sobrenadante e o pellet foi diluído com o auxílio de pérolas de vidro até apresentar turbides semelhante a escala-padrão de McFarland (1×10^7 bacilos/mL). O controle da concentração do inóculo (1×10^5), foi realizado através da

diluição seriada de 100, 1000, 10.000 e 100.000 vezes utilizando uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana (1×10^6). O volume de 100 µL de cada diluição foi plaqueado em meio 7H11 (DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA). Após o período de 28 dias de incubação as unidades formadoras de colônia (CFU) foram contadas com auxílio da lupa ZOOM 2000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) e os números de colônias obtidos foram corrigidos pelo fator de diluição de cada amostra. Os procedimentos realizados com a Mtb, inóculo e infecção foram realizados em laboratório de nível de biossegurança III.

4.5. Infecção intra-traqueal

Os animais foram anestesiados com 20% de cloridrato de ketamina (ketamina 10% - Agener União) e 10% xylazina (Dopaser) em solução salina via intraperitoneal. Os animais foram infectados pela traquéia (cirurgia) inoculando uma suspensão de 100 µL que continham 10^5 bacilos. Para quantificação do inóculo experimental, o mesmo foi plaqueado em meio 7H11 como descrito no ensaio de CFU.

4.6. Parâmetros da indução de obesidade

4.6.1. Pesagem semanal dos animais

Os animais foram pesados uma vez por semana durante 11 semanas (81 dias). Os pesos foram compilados nos respectivos grupos e os dados foram plotados em gráfico de curva para a avaliação da diferença significativa entre LFD e HFD.

4.6.2. Teste de glicemia

Após 8 semanas de dieta foi avaliada a glicemia dos animais, primordialmente antes da infecção com *M. tuberculosis*. Para isso, os animais foram submetidos a um jejum alimentar de no mínimo 6 horas com livre acesso à água. Posteriormente uma alíquota de sangue foi obtida da veia caudal dos animais sendo utilizada para dosagem da glicose com as tiras Accu-check® com auxílio do glicosímetro Accu-check Active (Roche).

4.6.3. Pesagem dos tecidos adiposos

Transcorridos 21 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e os tecidos adiposos retroperitoneal e mesentérico visceral foram retirados e pesados.

4.6.4. Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Após 21 dias de infecção os animais foram novamente submetidos a pelo menos 6 horas de jejum com acesso à água. Uma amostra de sangue, tempo 0, foi retirada pela veia caudal. Após, os animais receberam uma injeção de glicose no peritônio (D-(+)-Glucose, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) na concentração de (2g/Kg de peso corporal). Amostras de sangue da veia caudal foram coletadas em seis pontos: 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos. Os índices glicêmicos foram mensurados em cada tempo através do glicosímetro Accu-check Active Roche. A intolerância à glicose foi avaliada através da área sob a curva (AUC) utilizando o programa Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, USA).

4.6.5. Dosagem de insulina sérica

Após a infecção o sangue total dos animais submetidos a dieta foi centrifugado e o soro (25 µL) foi utilizado para a dosagem de insulina segundo o *kit Mouse Ultrasensitive Insulin* ELISA (Alpco Diagnostics, EUA).

4.7. Isolamento e Cultivo de Leucócitos pulmonares

Os animais foram eutanasiados após 21 dias de infecção com Mtb (ou 81 dias de dieta). Os pulmões foram coletados e conservados em placas de *Petri* de 22 mm de diâmetro (Corning, NY, USA) estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640. Os lóbulos médio e inferior direitos do pulmão foram fragmentados em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura e transferidos para tubos de 50 mL contendo 13 mL da solução de digestão (RPMI-1640 incompleto (Sigma, St Louis, MO, USA) acrescido de 0,5 mg/mL de Liberase (Liberase Blendzyme – Roche, Indianapolis, IN) e 25 U/mL de desoxiribonuclease (DNase) I de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, MO, USA). Em seguida, a suspensão celular foi incubada durante 30 minutos a 37°C, sob agitação constante (aprox. 250 rpm). Após a digestão, as células foram dispersas com auxílio de seringa de 10 mL e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sedimento celular resultante foi submetido ao protocolo de lise de hemácias, adicionando-se 2 mL de tampão de lise ACK (0,15 M de NH₄CL, 10 mM de KHCO₃, 0,1Mm de EDTA diluídos em H₂O) por 2 minutos, seguindo-se o acréscimo de 10 mL de PBS e posteriormente centrifugados a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 5 mL de RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO, USA) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco – Invitrogen, Grand Island, NY, USA). A suspensão foi filtrada utilizando-se malha estéril (*Cell strainer*, (BD Biosciences, Becton Circle, Durham, NC, USA), seguindo-se

centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI-1640 completo e quantificadas no contador automático *Cell Countess* (Invitrogen, EUA). Suspensão de 10^6 células foram plaqueadas em placas de 96 poços (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) e cultivadas sem estímulo (meio), ou em presença de PMA (*Phorbol 12-Myristate 13 Acetate*; 100 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, 28 EUA), Ionomicina (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e *GolgiPlug* (1 μ L/mL; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) durante 4 horas, à 37°C, pressão de 5% de CO₂ e umidade controlada. Decorrido o tempo de cultura, a suspensão celular foi coletada e processada para análise das populações de células por citometria de fluxo.

4.8. Citometria de fluxo

Todos os anticorpos utilizados para as marcações de moléculas de superfície e citocinas intracelulares foram previamente titulados e utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes BD e Biolegend.

4.8.1. Detecção de moléculas de superfície

Para a análise das populações celulares de neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, 10^6 células isoladas do pulmão foram incubadas a 4°C por 40 minutos com sobrenadante de cultura de células 2.4G2 (contendo anticorpos anti-Fc γ RII/III), diluído 1:1. As células foram incubadas com os anticorpos monoclonais previamente titulados durante 30 minutos a 4°C, longe da luz (Tabela 2). As células foram lavadas com 2 mL de tampão PBS contendo 2% SBF e foram fixadas com solução de 1% de formol. Foi adquirido pelo menos 100.000 eventos no citômetro FACSCantoTMII (BD, San José, CA, USA) de cada amostra. As células foram avaliadas por tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e intensidade de fluorescência. Primeiramente, através dos parâmetros FSC-A (área) e FSC-H (altura) foi realizada a exclusão das células agregadas também chamadas de *doublets*. As populações de linfócitos e células mieloides foram selecionadas a partir dos parâmetros FSC-A e SSC-A. Foram analisadas células T CD4⁺ e T CD8⁺; macrófagos pouco ativados (CD11c⁺CD11b^{low}F4/80⁺) e macrófagos mais ativados (CD11c⁺CD11b^{high}F4/80⁺), células dendríticas (CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁻CD103⁺ ou CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻), neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺) e monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6C^{high}). Os dados foram analisados utilizando-se o software FlowJoTM 7.6.1 (Tree Star, Inc. Ashland, Oregon, USA).

4.8.2. Detecção intracelular de citocinas

Após o período de cultura, as células foram coletadas e fixadas durante 11 minutos com 100 µL de PBS-formol 4% (Formaldeído, Synth – Diadema, SP, Brasil), à temperatura ambiente e posteriormente foi adicionado 1 mL de PBS 1X. Para a permeabilização da membrana a suspensão celular foi centrifugada a 453 x g, por 10 minutos a 4°C e lavada com 1 mL de PBS 1X para a retirada do formol, em seguida foi adicionado 1mL de tampão de permeabilização (1% de SBF e 0,2% de saponina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluídos em PBS 1X). A suspensão celular foi homogeneizada vigorosamente e centrifugada a 453 x g, por 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 30 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 20 µL de tampão de permeabilização contendo os anticorpos monoclonais (**Tabela 2**), durante 30 minutos, a 4°C, longe da luz. As células foram lavadas com 1 mL de tampão de permeabilização. Por fim, o sobrenadante foi dispensado e as células foram ressuspensas no tampão restante no tubo. As amostras foram adquiridas no FACSCantoTMII e analisadas utilizando-se o software FlowJoTM 7.6.1, como descrito no anteriormente.

Populações celulares	Anticorpo	Clone	Fabricante
Neutrófilos Monócitos	CD11c- PE Cy7	HL3	BD Bioscience, EUA
	CD11b- APC Cy7	M1/70	Biolegend, EUA
	Ly6C- Percp 5.5	AL-21	BD Bioscience, EUA
	Ly6G- APC	1A8	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

	CD206- PE	C068C2	Biolegend, EUA
	MHCII I ^a I ^e - FITC	M5/114.15.2	Biolegend, EUA
Células Dendríticas	CD11c- PE Cy7	HL3	BD Bioscience, EUA
	CD11b- APC Cy7	M1/70	Biolegend, EUA
	CD11b- BV711	M1/70	Biolegend, EUA
	CD103-PE	M290	BD Bioscience, EUA
	MHCII I ^a I ^e - FITC	M5/114.15.2	Biolegend, EUA
Linfócitos	CD3- PE Cy5	145-2C11	BD Bioscience, EUA
	CD3- Alexa 488	17A2	Biolegend, EUA
	CD4 – APC Cy7	RM4-5	Biolegend, EUA
	CD4- Alexa F 700	GK1.5	Biolegend, EUA
	CD8- PE	53-6.7	Biolegend, EUA
	Ki-67 FITC	SolA15	eBioscience, EUA
Citocinas	IFN γ -PE Cy7	XMG1.2	Biolegend, EUA
	IFN γ -BV711	XMG1.2	Biolegend, EUA
	IL-17-APC	TC11-18M 10.1	Biolegend, EUA

Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo.

4.9. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (CFU)

Uma alíquota no volume de 100 μ L foi retirada após a digestão dos fragmentos de pulmão passando por diluições seriadas em PBS 1X estéril. Um volume de 100 μ L das diluições 100, 1000, 10.000 e 100.000 vezes foi plaqueado em meio sólido 7H11:7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido de ágar bacteriológico (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). As placas foram

vedadas e incubadas a 37°C durante 28 dias. Após o período de incubação, as colônias foram contadas utilizando a lupa (Leica Microsystems, ZOOM 2000). O número de colônias foi corrigido de acordo com as diluições e expresso em Log₁₀ do número de CFU por pulmão.

4.10. Análise histopatológica

O lóbulo superior direito do pulmão e dos tecidos adiposos foram acondicionados em solução de formol tamponado (6,5g Na₂HPO₄, 4g NaH₂PO₄.H₂O e 370mL de formaldeído (37%), q.s.p 1L, pH=7,0). Os cortes de 5 µm foram corados com a coloração hematoxilina/eosina (H&E) para a visualização do infiltrado celular no pulmão e para observação do tamanho dos adipócitos. Cortes de 7 µm dos pulmões foram corados com Ziehl-Neelsen (ZN), para visualização das bactérias ácido-álcool resistentes. Os cortes e colorações foram realizados por Izaíra Brandão e Elaine Floriano. As análises histopatológicas de H&E e ZN foram realizadas pela Profa. Dra. 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, as vezes formando agregados linfóide 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 peribrônquica de células inflamatórias, predominantemente linfócitos e macrófagos xantomosos, formando frequentes agregados linfóides, na maior parte coalescentes, preservando raros espaços alveolares (inflamação grave).

4.11. Extração de RNA do tecido adiposo

Após a eutanásia dos camundongos, os tecidos adiposos viscerais foram retirados e macerados em 500µL de trizol através do auxílio de um homogeneizador S10NG IKA® T10 basic (IKA® - Werke GMHB & Co. KG, Staufen-Alemanha). Foi adicionado 200ul de clorofórmio seguido da centrifugação por 15 minutos a 12000 x g. A fase aquosa foi adicionada na coluna de purificação do kit RNAspin Mini RNA isolation kit (GE Healthcare) e o RNA foi extraído conforme instruções do fabricante do kit RNAspin mini. Por último, foi realizado a quantificação do RNA no espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Biotech).

4.12. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em Tempo Real

Para a completa degradação do DNA genômico, o RNA total foi tratado com a enzima *Amplification Grade DNase* (Invitrogen). Em seguida, foi utilizada a enzima *SuperScript II RNase* (Invitrogen) para a síntese do cDNA segundo fabricante. Foram utilizados *primers* específicos para regiões de interesse com o intuito de amplificar os cDNAs através da reação de PCR em tempo real (**Tabela 3**). Como controle negativo da reação utilizou-se alíquotas sem cDNA. Como gene endógeno foi utilizado a β_2 microglobulina. Para cada reação de PCR utilizou-se 10 mM de cada dNTP (Invitrogen), 10 pmoles de cada *primer* (Invitrogen), uma alíquota da amostra de cDNA contendo 400ng, 6,25 μ L do *kit* Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG com ROX (Invitrogen) e água ultra-pura (GIBCO), o volume final da reação foi de 13 μ L. A reação foi realizada no termociclador Rotor Gene-6000 (Cobbert Austrália). Para ativar a enzima *Taq DNA Polymerase Platinum*, a temperatura inicial foi de 50°C por 2 minutos, seguida de *Hot Start* (pré-aquecimento) a 95°C por 2 minutos. Em seguida, a reação foi submetida a 40 ciclos de amplificação: com desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 58°C por 30 segundos e extensão de fita complementar a 72°C por 30 segundos. A curva de dissociação (*melting*) foi realizada de 65°C a 95°C. A média do CT de cada grupo foi utilizada na equação Δ Ct, gene endógeno (β_2) menos o gene alvo, seguido do 2Δ Ct. O valor obtido no grupo controle WT-LFD foi considerado como expressão basal 1. Os valores (2Δ Ct) dos demais grupos experimentais foram divididos pelo (2Δ Ct) do grupo controle. Foram avaliadas a expressão gênica para IL-1 β e IL-1 α .

Gene	Sequência
Ms B2m (housekeeping)	Sense: CAC CCC CAC TGA GAC TGA TAC ATA
	Antisense: TCA CAT GTC TCG ATC CCA GTA GA
IL-1 α	Sense: CCA TAA CCC ATG ATC TGG AAG
	Antisense: AGA CTA CAG TTC TGC CAT TGA CCAT
IL-1 β	Sense: GTTTAATTCGATGATACGCGAG
	Antisense: TTAASCCGACACCTCACGG

Tabela 3. Sequência de primers utilizados durante a reação de PCR em tempo real.

4.13. Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A detecção das citocinas IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-1 α , IL-6 e IL-17 foram realizadas por meio de kit BD OptEIA Set (BD Biosciences, San Diego, California, EUA) e DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA) (**Tabela 4**). Inicialmente, as placas foram sensibilizadas “*overnight*” com o anticorpo de captura, diluído em tampão de bloqueio. Após esse período as placas foram lavadas, bloqueadas e incubadas a temperatura ambiente e lavadas novamente. As amostras e a curva padrão foram incubadas por duas horas à 4°C e lavadas. Por fim, o anticorpo biotinizado foi incubado por meia hora, quando recebeu a solução streptavidina. Após nova lavagem, a placa recebeu a solução reveladora TMB (BD Biosciences, San Diego, California, EUA), por vinte minutos, e essa reação foi interrompida com H₂SO₄ a 16%. As amostras foram lidas a 450/570nm no leitor Versamax (Molecular Devices, California, EUA).

Kit ELISA	Captura	Detecção	Ponto Inicial da Curva	Ponto Final da Curva
IL-17	1:250	1:250	1000 pg/mL	7, 213 pg/mL
IL-1 β	1:250	1:250	2000 pg/mL	7,813 pg/mL
IL-1 α	2ug/mL	100ng/mL	1000pg/mL	15.6pg/mL
IFN- γ	1:250	1:250	2000pg/mL	31,3 pg/mL
IL-6	2,00ug/mL	150ng/mL	1000 pg/mL	15.6pg/mL
IL-12	1:250	1:250	4000 pg/mL	62.5pg/mL

Tabela 4. Limite de detecção dos kits imunoenzimáticos.

4.14. Diferenciação de macrófagos (BMDMs) e células dendríticas (BMDCs) a partir de precursores de medula óssea

O conteúdo interno do fêmur de animais WT, IL-1R e IL-1 α *naives* ou submetidos a dieta e infectados, foram incubados com meio RPMI-C contendo 30% de sobrenadante do cultivo de células L929 (Fator estimulante de colônias de macrófagos de 20 ng / mL (M-CSF) (PeproTech,

Rocky Hill, NJ, EUA) para a diferenciação em macrófagos ou (GM-CSF 20 ng / mL) para células dendríticas em placas de Petri (BD OPTILUX). No dia 3 foi adicionado 8 mL de meio RPMI-C suplementado nas culturas de macrófagos e 10 mL de meio RPMI-C contendo 40 ng / mL de GM-CSF para as culturas de células dendríticas. Após 7 dias, os BMDMs de animais *naive* foram submetidos aos ensaios de killing e fagocitose e os BMDMs provenientes de animais infectados alimentados com dieta foram plaqueados em condições estimulantes para a polarização de macrófagos M1 ou M2 através de 1 µg / mL LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou 30 ng / mL IL-4 (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA). As BMDCs de animais WT submetidos a dieta foram estimuladas com antígeno de TB e foram cultivadas em cocultura.

4.15. Ensaio de Killing e Fagocitose

Para a realização do ensaio de killing e fagocitose foi utilizado 2.5×10^5 BMDM os quais foram plaqueados em quadruplicata em placas de 24 poços, e após 4 horas, as células foram infectadas com Mtb (MOI 5). O meio de cultura foi substituído por RPMI-1640 após 4 horas de infecção contendo 10% de FBS contendo 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). Nesse momento, foi realizado o ensaio de fagocitose. Os poços foram lavados duas vezes com 2mL de PBS 1X em temperatura ambiente e as células foram lisadas com 200 ul de solução 0.05% de saponina. Uma alíquota de 100ul foi utilizada para realizar o ensaio de CFU. Após 24 horas, o ensaio de *killing* foi realizado. O sobrenadante foi coletado, e as células foram lisadas para a realização do ensaio de CFU como descrito anteriormente.

4.16. Ensaio de cocultura de BMDCs de animais infectados e submetidos a dieta e células CD4⁺ de animais WT infectados

1×10^5 BMDCs foram plaqueadas em placa de 96 poços (Corning®, NY, EUA) e foram estimuladas com 50µg/mL de antígenos proteicos do lisado de Mtb durante 24 horas. O baço de animais infectados foi macerado e filtrado com o auxílio de *cell strainer* (Corning®, NY, EUA). 2×10^5 células T (CD4⁺) isoladas a partir de células totais do baço de animais WT infectados foram adicionadas na cultura. As células CD4⁺ foram isoladas através de *MACS CD4⁺ cell isolation kit II* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). 3×10^7 esplenócitos foram separados e nessa suspensão foram adicionados 400µL de tampão de *beads* contendo 0,5% de albumina bovina (fração V) (BSA- Inlab, São Paulo, SP, Brasil) e 2 mM de EDTA (Invitrogen by life

Biotechnologies™, Carlsbad, CA, USA) diluídos em PBS 1X. Em seguida, foram adicionados 100 µL de *CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail*, e a suspensão foi agitada e incubada por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, foram adicionados à suspensão 300 µL de tampão de *beads* e 200µL de *Anti-Biotin MicroBeads*, seguindo-se a homogeneização e incubação por 15 minutos, a 4°C. Após a incubação, 10 mL de tampão de *beads* foram adicionados para lavar a suspensão. O sedimento celular foi ressuspensão em 500 µL de tampão de *beads*. As colunas magnéticas de depleção LD (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) foram preparadas no suporte *MACS Separator*, e, então, a suspensão celular foi aplicada. As células não marcadas (células T CD4⁺) que passaram pela coluna foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. A cultura foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Transcorrido 44 horas de cultura o sobrenadante foi recolhido e as células foram estimuladas com PMA (*Phorbol 12-Myristate 13 Acetate*; 100 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, 28 EUA), Ionomicina (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e *GolgiPlug* (1 µL/mL; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) durante 4 horas, à 37°C, pressão de 5% de CO₂ e umidade controlada. Como um controle negativo, células CD4⁺ do baço purificado foram estimuladas. Decorrido o tempo de cultura, a suspensão celular foi coletada e processada para análise das populações de linfócitos por citometria de fluxo.

4.17. Tratamento com anticorpo anti-IL-1β em animais WT submetidos a dieta

Animais WT foram submetidos a dieta LFD e HFD durante o total de 11 semanas. Entre a 6^a até 8^a semana os animais receberam 3 doses por semana via intraperitoneal de anticorpo anti-IL-1β (BioXcell clone: B122) na concentração de 1mg/kg em 200 µl de PBS 1x. Após o tratamento os animais foram infectados com 1x10⁵ bacilos via intra-traqueal. Foram coletadas amostras de sangue através do plexo retro-orbital com auxílio de uma pipeta Pasteur 24 e 48 horas antes da primeira dose e após a última dose. A partir do pulmão foi realizado o ensaio de CFU como descrito anteriormente.

4.18. Reconstituição dos animais IL-1α^{-/-}

Animais IL-1α^{-/-} foram submetidos a dieta durante 11 semanas. A partir da 7^a até 11^a semana os animais receberam o tratamento com IL-1α recombinante (Peprotech, EUA). Na 7^a semana os animais receberam 3 doses de 500ng em 200µl de PBS 1X via intraperitoneal. Os animais foram infectados com 1x10⁵ bacilos via intra-traqueal na 8^a semana e no decorrer da infecção os animais

receberam 10 doses via intranasal contendo 50ng em 25µl de PBS 1X. Foi realizado o ensaio de CFU e as células do pulmão foram submetidas a cultura celular. Suspensão de 10^6 células foram plaqueadas em placas de 96 poços (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) e cultivadas sem estímulo (meio), ou em presença de PMA (*Phorbol 12-Myristate 13 Acetate*; 100 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, 28 EUA), Ionomicina (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e *GolgiPlug* (1 µL/mL; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) durante 4 horas, à 37°C, pressão de 5% de CO₂ e umidade controlada. Decorrido o tempo de cultura, a suspensão celular foi coletada e processada para análise das populações de células por citometria de fluxo.

4.19. Análise da microbiota

4.19.1. Extração do DNA das fezes

A microbiota comensal das fezes de animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ foi avaliada por PCR em tempo real. O DNA foi extraído usando o *Kit QIAamp DNA Stool Mini* (Qiagen) segundo instruções do fabricante.

4.19.2. Reação em PCR em Tempo Real de amostra de fezes

Para cada reação de PCR foram utilizados 10 ng de DNA a partir das amostras no volume total de 4 µL, além de, 0,5 µL do *primer* forward (10 nm), 0,5 µL do *primer* reverse (10 nm) e 5 µL do *GoTaq qPCR Master Mix* (PROMEGA), sendo o volume final de 10 µL para cada reação. A reação foi realizada no aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A placa (Applied biosystems) contendo 96 reações foi submetida a temperatura 95°C por 10 minutos para a desnaturação das amostras e concomitante ativação da enzima *Taq DNA Polymerase Platinum*. Em seguida, a reação foi submetida a 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo constituiu-se de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 58°C para os filos Firmicutes e Bacteroidetes por 30 segundos, e extensão de fita complementar a 72°C por 30 segundos (**Tabela 5**). A curva de dissociação (*melting*) foi realizada a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Os resultados foram analisados pelo *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Software*. A média do CT de cada grupo foi utilizada na equação ΔCt , gene endógeno (16S) menos o gene alvo, seguido do $2\Delta Ct$. O valor obtido no grupo controle WT-LFD foi considerado como expressão basal 1. Os valores ($2\Delta Ct$) dos demais grupos experimentais foram divididos pelo ($2\Delta Ct$) do grupo controle.

Filos de bacterias	Sequência
Bacteroidetes	Sense: GTT TAA TTC GAT GAT ACG CGA G Antisense: TTA ASC CGA CAC CTC ACG G
Firmicutes	Sense: ATG TGG TTT AAT TCG AAG CA Antisense: AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC
16S	Sense: AAC AGG ATT AGA TAC CCT GGT AG Antisense: GGT TCT TCG CGT TGC ATC

Tabela 5. Sequência dos primers para a análise da microbiota.

4.20. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o programa Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, USA). Para análise de normalidade, os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov. Para a análise de dois grupos se tiveram uma distribuição normal, foram analisados aplicando teste t não pareado (*Unpaired*) e, se não tiveram uma distribuição normal, foram analisados pelo teste não paramétrico Mann Whitney. Para a análise de mais de dois grupos experimentais aqueles 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 quando considerados estatisticamente significativos foram simbolizados como * $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$.

5. RESULTADOS

5.1. Produção de IL-1 β e IL-1 α nos homogenatos de pulmões de animais obesos e infectados

Fêmeas de 6 semanas da linhagem C57BL/6 foram alimentadas com LFD ou HFD durante 8 semanas, seguindo-se a infecção com 1×10^5 bacilos por via intra-traqueal, como ilustra a **Figura 1A**. A **Figura 1B** e **1C** confirmam que a dieta hiperlipídica tornou os animais obesos. As concentrações de IL-1 α e IL-1 β , mensuradas por ELISA em amostras de homogenatos de pulmão 3 semanas após infecção, foram significativamente maiores no grupo HFD infectado comparado ao grupo LFD infectado (**Figura 1D, 1E**).

Figura 1 Produção de IL-1 β e IL-1 α nos homogenatos de pulmões de animais obesos e infectados.

Desenho experimental de alimentação com dieta padrão (Low Fat Diet - LFD) ou dieta hiperlipídica (High Fat Diet- HFD) em camundongos fêmeas C57BL/6 de 6 semanas de idade alimentados por 11 semanas (a). Representação dos animais alimentados com LFD ou HFD (b). Peso dos animais na 8ª semana (c). Produção de IL-1 β (d) e IL-1 α (e) nos pulmões. Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.2. Avaliação dos parâmetros da obesidade durante a infecção com *M. tuberculosis* nos animais deficientes para expressão do receptor IL-1R ou de IL-1 α

A sinalização IL-1/IL-1R confere proteção contra a tuberculose experimental (Juffermans et al. 2000; Fremond et al. 2007; Yamada et al. 2000) e também está associada com a intolerância à glicose e resistência à insulina decorrente da obesidade induzida pela dieta (Dror et al. 2017). Além disso, a ausência do receptor IL-1R reduziu a metainflamação (McGillicuddy et al. 2011). Esses estudos e o aumento nos níveis de IL-1 α e IL-1 β nos levaram à hipótese de que o eixo IL-1/IL-1R poderia aumentar a magnitude da inflamação pulmonar e a suscetibilidade à infecção na comorbidade obesidade e tuberculose. Os animais *WT*, *IL-1R*^{-/-} e *IL-1 α* ^{-/-} foram alimentados com HFD ou LFD, como ilustra o delineamento experimental (**Figura 2A**). Após 8 semanas de HFD, confirmamos a obesidade induzida por dieta, independente fenótipo *WT* ou *knockout* (**Figura 2B-C**). O ganho de peso significativo ocorreu a partir da 6^a semana e manteve-se até a 8^a semana, quando foram infectados, e avaliados na 11^a semana (**Figura 2D**). Após a infecção, os animais perderam peso, mas continuaram com peso corporal aumentado como representado na curva de peso dos animais *WT*, *IL-1R*^{-/-} e *IL-1 α* ^{-/-} (**Figura 2D**). Os animais *WT*, *IL-1R*^{-/-} e *IL-1 α* ^{-/-} foram avaliados aos 21 dias após a infecção, pois observamos em experimentos realizados anteriormente que os animais *IL-1R*^{-/-} e *IL-1 α* ^{-/-} sucumbiam à infecção antes dos 30 dias.

Figura 2. Avaliação dos parâmetros da obesidade durante a infecção com *M. tuberculosis* nos animais deficientes para expressão do receptor IL-1R ou de IL-1 α .

Desenho experimental de alimentação com dieta padrão (Low Fat Diet - LFD) ou dieta hiperlipídica (High Fat Diet- HFD) em camundongos fêmeas C57BL/6 WT, IL-1R^{-/-} e IL-1 α ^{-/-} de 6 semanas de idade alimentados por 11 semanas (a). Representação dos animais alimentados com LFD ou HFD (b). Peso dos animais na 8ª semana (c). Curva de peso semanal entre HFD e LFD (d). Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos LFD e HFD.

5.3. Expressão de IL-1 β e IL-1 α no tecido adiposo dos animais WT e IL-1 $\alpha^{-/-}$, obesos

Caracterizando melhor o modelo de obesidade induzida por dieta, também observamos que os animais *WT*, *IL-1R^{-/-}* e *IL-1 $\alpha^{-/-}$* alimentados com HFD apresentaram aumento do peso dos tecidos mesentéricos viscerais (**Figura 3A**) e retroperitoneais (**Figura 3B**) comparados ao grupo LFD. A análise histológica mostrou hipertrofia do tecido adiposo nos grupos alimentados com HFD comparados aos respectivos grupos LFD (**Figura 3C**). Não foi observada diferença na hipertrofia de tecido adiposo entre os animais dos grupos *WT*, *IL-1R^{-/-}* ou *IL1 $\alpha^{-/-}$* submetidos à dieta hiperlipídica (**Figura 3C**). A obesidade induz aumento na produção de citocinas próinflamatórias em consequência do acúmulo de macrófagos polarizados e recrutados através dos estímulos da hipertrofia do tecido adiposo (Kanneganti and Dixit 2012). Assim, os tecidos adiposos foram coletados para análise da expressão gênica para IL-1 α e IL-1 β . A citocina IL-1 β foi diferencialmente expressa nos tecidos adiposos de animais WT obesos comparados aos animais do grupo LFD (**Figura 3D**). Porém, a ausência na expressão de IL-1 α afetou a expressão de IL-1 β no tecido adiposo de animais obesos, cuja expressão gênica foi baixa comparada à dos animais WT obesos (**Figura 3D**). Além disso, a obesidade não afetou a expressão de IL-1 α no tecido adiposo (**Figura 3E**). No entanto, a IL-1 α estava aumentada no soro de animais WT alimentados com HFD (**Figura 3F**).

Figura 3. Expressão gênica de IL-1 β e IL-1 α no tecido adiposo dos animais WT e IL-1 α ^{-/-}, obesos.

Os animais WT, IL-1R^{-/-}, IL-1 α ^{-/-} alimentados com HFD apresentaram aumento do peso dos tecidos adiposos mesentéricos viscerais (a) e retroperitoneais (b). Fotomicrografias de secções de tecido adiposo retroperitoneal (c). Expressão de IL-1 β a partir no tecido mesentérico visceral dos animais WT LFD (n=14), HFD (n=12) e IL-1 α ^{-/-} LFD (n=9), HFD (n=8) (d). Expressão de IL-1 α a partir no tecido mesentérico visceral dos animais WT LFD (n=12), HFD (n=10) (e). Produção de IL-1 α a partir do soro de animais WT obesos (f). Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.4. Avaliação da glicemia nos animais WT, IL-1R^{-/-} e IL-1α^{-/-}, obesos e infectados

Estudos clínicos e experimentais mostraram que o consumo de dietas calóricas induzem a intolerância à glicose e resistência à insulina (Czech 2017). Trabalhos também ressaltaram que a ausência da sinalização mediado pelo IL-1R pode interferir na resistência à insulina como também na intolerância à glicose (McGillicuddy et al. 2011, 2013). Dessa forma, para confirmar a hiperglicemia após a dieta foi mensurada a glicose em jejum nos animais WT, IL-1R^{-/-} e IL-1α^{-/-} após 8 semanas de dieta, antecedendo a infecção (**Figura 4A**). Além disso, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT) e à dosagem de insulina sérica. Animais WT-LFD foram mais intolerantes à glicose quando comparado ao grupo WT-HFD. Foi possível observar que os animais IL-1R^{-/-}, alimentados com LFD e HFD foram mais intolerantes à glicose quando comparado ao grupo controle (WT-LFD) (**Figura 4B**). Por outro lado, os animais IL-1α^{-/-} alimentados com HFD mostraram-se tão intolerantes à glicose quanto o grupo WT HFD, ambos comparados com seus respectivos grupos controles, IL-1α^{-/-}-LFD e WT-LFD, respectivamente (**Figura 4C**). Dessa forma, evidenciamos diferente do que está descrito na literatura (McGillicuddy et al. 2011), que a ausência da sinalização IL-1/IL-1R, de certo modo, interfere no metabolismo da glicose e a ausência de IL-1α não parece estar relacionada com a hiperglicemia.

Para complementar os achados relacionados com a hiperglicemia, quantificamos a insulina sérica e observamos que os animais WT alimentados com HFD tiveram redução nos níveis de insulina comparado ao respectivo grupo LFD, enquanto nos animais deficientes para IL-1α, os níveis reduzidos de insulina não foram diferentes entre os grupos IL-1α^{-/-}-HFD e IL-1α^{-/-}-LFD, sugerindo que a IL-1α não parece estar envolvida com a resistência à insulina decorrente da obesidade induzida por dieta. No entanto, a ausência de IL-1α afetou negativamente os níveis de insulina nos animais magros (WT-LFD versus IL-1α^{-/-}-LFD) (**Figura 4D**).

A **B** **C**

Figura 4. Avaliação da glicemia nos animais WT, IL-1R^{-/-} e IL-1 α ^{-/-}, obesos e infectados.

Glicemia dos animais WT, IL-1R^{-/-}, IL-1 α ^{-/-} alimentados com HFD (a). Curva de tolerância a glicose e área sobre a curva dos animais IL-1R (b) e IL-1 α (c) obesos. Produção de insulina sérica dos animais WT e IL-1 α ^{-/-} (d). Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.5. Avaliação do número de bacilos nos animais IL-1R^{-/-} obesos

Sabendo que a sinalização IL-1/IL-1R confere proteção na TB e participa da resposta inflamatória na obesidade, nossa hipótese era de que a ausência da sinalização IL-1/IL-1R nos animais alimentados com HFD tornaria tais animais mais resistentes à infecção porque o grau inflamatório nos seus pulmões seria reduzido, e tais animais se comportariam de modo similar aos animais WT-LFD. As **Figura 5A** e **5B** mostram que os animais WT-HFD foram mais suscetíveis que os animais WT-LFD, confirmando resultados prévios de nosso grupo. Além disso, confirma os dados da literatura de que os animais IL-1R^{-/-}-LFD foram mais suscetíveis que os animais WT-LFD (Fremond et al. 2007). Diferente do que esperávamos, não houve diferença no número do bacilos recuperados dos pulmões de animais dos grupos obesos: WT-HFD e IL-1R^{-/-}-HFD. Também não houve diferença entre os grupos IL-1R^{-/-}-LFD e IL-1R^{-/-}-HFD.

A análise histopatológica, apresentada na **Figura 5C**, mostra quantidade moderada de células inflamatórias ao redor dos vasos e bronquíolos nos pulmões dos animais WT-LFD e aumento no grau de inflamação nos pulmões de animais WT-HFD. Além disso, os pulmões dos animais IL-1R^{-/-}-LFD e IL-1R^{-/-}-HFD mostraram menor *score* inflamatório comparado ao grupo WT-HFD (**Figura 5D**). Dessa forma, o mecanismo que desencadeia o aumento da susceptibilidade dos animais submetidos a dieta HFD não é dependente exclusivamente do receptor para IL-1 (IL-1R). Além disso, para ressaltar os dados da literatura também foi observada uma correlação positiva entre hiperglicemia e o ensaio de CFU (Thaiss et al. 2018) (**Figura 6E**). Dessa forma, ressaltando a veracidade dos dados prévios do nosso grupo como também a importância desse trabalho.

Figura 5. Avaliação do número de bacilos nos animais IL-1R^{-/-} obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 1. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram diluídas em série para realização do ensaio de CFU (a). A partir de secções do tecido do lóbulo superior direito foram realizadas as colorações de Ziehl-Neelsen (aumento de 40x) (b) e Hematoxilina e Eosina (aumento de 40x) (c). Análise histopatológica (d). Correlação da AUC e CFU (e). Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.6. Análise dos leucócitos da imunidade inata nos pulmões dos animais IL-1R^{-/-} obesos

O aumento da inflamação pulmonar nos grupos deficientes para a expressão de IL-1R nos levou a avaliar as populações de leucócitos da imunidade inata. Nossos resultados mostram que a obesidade ou a ausência do IL-1R não afetou as populações de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁺ ou CD11c⁺CD103⁺ e monócitos CD11b⁺Ly6C^{high} **Figuras 6 e 7**, respectivamente. Embora a obesidade não tenha afetado, regulando positivamente o influxo de neutrófilos para os pulmões, ausência de IL-1R afetou o influxo de neutrófilos, independente da dieta (**Figura 8**).

Figura 6. Frequência de células dendríticas $CD11c^+ CD11b^+$ e $CD11c^+ CD103^+$ nos animais WT e $IL-1R^{-/-}$, obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Estratégia de gates (a). Controles de fluorescência (b). Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (c). Frequência de células $CD11c^+ CD11b^+$ (d) e $CD11c^+ CD103^+$ (e). Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

Figura 7. Frequência de monócitos CD11b⁺ Ly6C^{high} nos animais WT e IL-1R^{-/-}, obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Estratégia de gates (a). Controles de fluorescência (b). Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (c). Frequência de células CD11b⁺ Ly6C^{high} (d). Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

Figura 8. Frequência de neutrófilos CD11b⁺ Ly6G⁺ nos animais WT e IL-1R^{-/-}, obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Estratégia de gates (a). Controles de fluorescência (b). Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (c). Frequência de células CD11b⁺ Ly6G⁺ (d). Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.7. Avaliação de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-17 nos pulmões dos animais IL-1R^{-/-} obesos

Em seguida, avaliamos as populações de linfócitos produtores de IFN- γ ou IL-17. A estratégia de gate, controles de fluorescência e a análise representativa são apresentadas na **Figura 9A**, **9B** e **9C**. Como descrito na tese da Doutora Sandra Palma, os animais obesos WT-HFD apresentaram aumento de linfócitos produtores de IFN- γ e IL-17 comparados ao grupo WT-LFD (**Figura 9D**). A ausência do receptor IL-1R, independente da obesidade, não alterou a frequência de células do perfil Th1 (**Figura 9D**). Porém, IL-1R foi importante para a diferenciação ou expansão de células Th17 tanto em animais obesos quanto magros (**Figura 9E**). A avaliação de citocinas em homogenatos de pulmão por ELISA fornece a quantificação *ex vivo*. Os animais WT-HFD e IL-1R^{-/-}-HFD apresentaram aumento da produção de IFN γ comparados aos seus respectivos grupos controles (WT-LFD e IL-1R^{-/-}-LFD) (**Figura 9F**). Os animais IL-1R^{-/-}-HFD apresentaram produção de IL-12 significativamente maior quando comparados ao grupo WT HFD (**Figura 9G**).

F **G**

Figura 9. Avaliação de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-17 nos pulmões dos animais IL-1R^{-/-} obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Estratégia de gates (a). Controles de fluorescência (b). Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (c). Frequência de células CD4⁺ IFN γ ⁺ (d) e CD4⁺ IL-17⁺ (e). Produção de IFN γ (f) e IL-12 (g) nos pulmões. Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.8. Animais obesos tratados com anti-IL-1 β

Como a deficiência na expressão do IL-1R suprime a via de sinalização para IL-1 α , IL-1 β e para o antagonista do receptor de IL-1 (Fremond et al. 2007; Katrin D Mayer-Barber et al. 2014b), a hipótese de que esses animais deficientes e obesos seriam menos suscetíveis à infecção com *M. tuberculosis* como consequência de redução da resposta inflamatória. Trabalhos na literatura já ressaltam o papel benéfico do bloqueio da IL-1 β nas doenças inflamatórias (Ridker 2017). Dessa forma, utilizamos o anticorpo neutralizante para IL-1 β no modelo de obesidade e tuberculose.

A **Figura 10A** ilustra o delineamento experimental, no qual animais WT receberam 3 doses de anticorpo contra IL-1 β no período de constatação de significativo ganho de peso, antes da infecção. Como mostra a **Figura 10B**, os animais alimentados com HFD quando tratados com anticorpo contra IL-1 β apresentaram significativa redução no número de CFU e da inflamação pulmonar (**Figura 10C-E**).

Figura 10. Animais obesos tratados com Anti-IL- β .

Camundongos C57BL/6 WT foram alimentados até a 6^a semana quando receberam doses i.p. do anticorpo até a 8^a semana quando foram infectados (a). Vinte e um dias após infecção os pulmões foram coletados para o ensaio de CFU (b). A partir de secções do tecido do lóbulo superior direito foram realizadas as colorações de Ziehl-Neelsen (aumento de 40x) (c) e Hematoxilina e Eosina (aumento de 40x) (e). Análise histopatológica (e). Os dados são representativos de um experimento. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.9. Análise da carga bacilar em animais IL-1 α ^{-/-} obesos e tratados com IL-1 α recombinante

A IL-1 β realmente parece ter um efeito deletério na comorbidade obesidade e tuberculose, e isso não ficou evidente quando suprimimos a sinalização via IL-1R. Desse modo, nós também investigamos o efeito da IL-1 α , que sinaliza pelo mesmo receptor. Animais deficientes para IL-1 α (IL-1 α ^{-/-}) foram alimentados com HFD ou LFD, como descrito anteriormente, e comparados com os respectivos grupos controles, WT-HFD e WT-LFD. Confirmamos resultados prévios que a obesidade aumenta a suscetibilidade à infecção com *M. tuberculosis* e a inflamação pulmonar, no entanto, os animais IL-1 α ^{-/-} (LFD e HFD) foram mais suscetíveis e tiveram aumento da inflamação pulmonar quando comparados ao grupo WT (LFD-HFD) respectivamente (**Figura 11A-D**). Paralelamente, animais IL-1 α ^{-/-} foram tratados com 5 doses de citocina IL-1 α recombinante (rIL-1 α) a partir da 6^a semana de alimentação com HFD, quando a obesidade se torna significativamente aparente, seguindo-se a infecção com *M. tuberculosis* na 8^a semana, acompanhado de 10 doses intrasais de (rIL-1 α) (**Figura 12A**). O tratamento com rIL-1 α ou reposição de IL-1 α aumentou a resistência dos animais IL-1 α ^{-/-} obesos (**Figura 12B**).

Figura 11. Análise da carga bacilar em animais IL-1α^{-/-} obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram diluídas em série para realização do ensaio de CFU (a). A partir de seções do tecido do lóbulo superior direito foram realizadas as colorações de Ziehl-Neelsen (aumento de 40x) (b) e Hematoxilina e Eosina (aumento de 40x) (c). Análise histopatológica (d). Os dados são representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

Figura 12. Animais obesos IL-1 α ^{-/-} tratados com IL- α recombinante.

Camundongos IL-1 α ^{-/-} foram tratados a partir da 7^a semana até a 11^a semana com IL-1 α recombinante (a). Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram diluídas em série para realização do ensaio de CFU (b). A partir de seções do tecido do lóbulo superior direito foram realizadas as colorações de Ziehl-Neelsen (aumento de 40x) (c) e Hematoxilina e Eosina (aumento de 40x) (d). Análise histopatológica (e). Os dados são representativos de um experimento. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.10. Avaliação de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-17 nos pulmões dos animais IL-1 α ^{-/-} obesos, e tratados com IL-1 α recombinante

A seguir, as populações CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-17⁺ foram determinadas nos pulmões dos animais WT e IL-1 α ^{-/-}, alimentados com HFD ou LFD. A análise representativa e os resultados compilados mostram redução de ambas as populações CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-17⁺ no grupo IL-1 α ^{-/-}-HFD comparado ao grupo WT-HFD, sugerindo que a ausência de IL-1 α afeta as células Th17 (**Figura 13A-C**). Em adição, a obesidade também afetou o perfil Th17, como constatada pela redução de CD4⁺ IL-17⁺ no grupo IL-1 α ^{-/-}-HFD comparado ao grupo IL-1 α ^{-/-}-LFD (**Figura 13A-C**). As concentrações de IFN- γ e de IL-17 também estavam reduzidas nos homogenatos de pulmões do grupo IL-1 α ^{-/-}-HFD comparado com o grupo WT-HFD, corroborando os dados de citometria de fluxo (**Figura 13D-E**). Do contrário, o tratamento com IL-1 α recombinante, resultou em aumento significativo na população CD4⁺IL-17⁺, mas não na população CD4⁺IFN- γ ⁺ nos pulmões de animais do grupo IL-1 α ^{-/-}-HFD comparado ao grupo IL-1 α ^{-/-}-HFD não tratado (**Figura 13F-H**).

Na tentativa de associar os dados do número de CFU e a frequência de linfócitos, encontramos uma correlação inversa entre CFU e frequência de células CD4⁺IL-17⁺, enquanto não houve correlação entre CFU e frequência de células CD4⁺IFN- γ ⁺ (**Figura 14A-B**).

Figura 13. Avaliação de células CD4⁺ produtoras de IFN-γ ou IL-17 nos pulmões dos animais IL-1α^{-/-} obesos, e tratados com IL-1α recombinante.

Os animais foram alimentados como descrito na figura 2 e quando tratados como na figura 12a. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (a). Frequência de células CD4⁺ IFN-γ⁺ (b) e CD4⁺ IL-17⁺ (c). Produção de IFN-γ (d) e IL-17 (e) nos pulmões. Representativos da análise de citometria de fluxo das populações após o tratamento (f). Frequência de células CD4⁺ IFN-γ⁺ (g) e CD4⁺ IL-17⁺ (h). Os dados são representativos de um experimento reproduzido uma a duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

Figura 14. Correlações entre CFU, células CD4⁺ IFN γ ⁺ ou CD4⁺ IL-17⁺.

Realizamos análise de correlação do número de CFU e porcentagem de células CD4⁺IFN γ ⁺ (a), CD4⁺IL-17⁺ (b). Os dados são de quatro experimentos. Para análise estatística da correlação, foi aplicado o teste de Pearson (R). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5.11. Caracterização *in vitro* e *in vivo* de macrófagos de animais WT e deficientes para IL-1 α , obesos

Como a ausência de IL-1 α reduziu as populações de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺IL-17⁺ no grupo obeso comparado ao grupo WT-HFD, analisamos os leucócitos da imunidade inata. Primeiramente, realizamos experimentos com macrófagos derivados de medula óssea com o intuito de avaliar o perfil inflamatório dessas células na condição de obesidade ou na ausência de IL-1 α . Macrófagos derivados da medula óssea de animais WT-HFD estimulados com LPS apresentaram aumento da produção de IL-6 e Nitrito (**Figura 15 A-C**). Dessa forma, a obesidade pode interferir na capacidade inflamatória dessas células (Boutagy et al. 2016). Macrófagos derivados da medula óssea de animais WT e IL-1 α ^{-/-} magros infectados não apresentaram diferenças na produção de IL-6. No entanto, a produção de IL-1 β foi restringida quando deficientes para IL-1 α (**Figura 16 A-C**).

Sabe-se que a IL-1 α induz a proliferação e maturação durante a formação do granuloma por macrófagos alveolares CD11b^{low} e consequentemente, altera suas funções microbidas (Huaux et al. 2015). Isto posto, a ausência de IL-1 α talvez alteraria a produção de IL-1 β e o fenótipo dos macrófagos de animais obesos. Em seguida, avaliamos as populações de macrófagos nos pulmões de animais WT ou IL-1 α ^{-/-}, obesos e infectados. A estratégia de gate, controles de fluorescência e a análise representativa são apresentadas na **Figura 17A, 17B e 17C**. Células F4/80⁺, exclusivamente macrófagos, foram subdivididas em populações CD11c⁺ CD11b⁺ e CD11c⁺ CD11b^{low}. Nossos resultados mostram que a obesidade ou a ausência do IL-1 α não afetou as populações de macrófagos CD11c⁺CD11b⁺ (**Figuras 17D**). Entretanto, animais IL-1 α ^{-/-}HFD apresentaram redução na frequência de células CD11c⁺ CD11b^{low} em comparação ao grupo IL-1 α ^{-/-}LFD (**Figuras 17D**).

Figura 15. Concentrações de IL-6 e nitrito no sobrenadante de macrófagos WT obesos e infectados.

Os animais foram alimentados e infectados como descrito anteriormente. Macrófagos derivados da medula óssea de animais magros e obesos foram estimulados com LPS (100ng/mL) (a). Concentrações de IL-6 (b) e Nitrito (c) a partir do sobrenadante da cultura. Os dados são de três experimentos. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

Figura 16. Concentração de IL-6 e IL-1β no sobrenadante de macrófagos IL-1α^{-/-}.

Macrófagos derivados da medula óssea de animais WT e IL-1α^{-/-} foram infectados com *M. tuberculosis* usando um MOI de 5 bacilos para uma célula (MOI 5) e o sobrenadante da cultura foi coletado após 24 horas (a). Concentrações de IL-6 (b) e IL-1β (c) no sobrenadante da cultura. Os dados são representativos de um experimento. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

Figura 17. Frequência de macrófagos CD11b⁺ CD11c⁺ e CD11b^{low} CD11c⁺ nos animais WT e IL-1 $\alpha^{-/-}$, obesos. Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Estratégia de gates (a). Controles de fluorescência (b). Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (c). Frequência de células CD11c⁺CD11b⁺ (d) e CD11c⁺CD11b^{low} (e). Os dados são representativos de um experimento. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.12. Análise da frequência de células CD4⁺ IFN γ ⁺ e CD4⁺ IL-17⁺ em cocultura de células dendríticas de animais IL-1 α ^{-/-} com células CD4⁺ de animais infectados

Até o momento, nossos resultados indicam que os animais obesos infectados apresentam aumento nas células CD4⁺ produtoras de IFN γ e IL-17 dependentes da citocina IL-1 α . Ou seja, animais quando deficientes para IL-1 α obesos (IL-1 α ^{-/-}-HFD) exibiram redução dos perfis Th1 e Th17, os quais foram revertidos após o tratamento. O ensaio de cocultura de células dendríticas provenientes de animais HFD não foram capazes de induzir o aumento da indução dos perfis Th1 e Th17, dados não mostrados.

Portanto, nos propusemos avaliar a capacidade de indução e proliferação desses perfis em um ensaio de cocultura com células dendríticas IL-1 α ^{-/-} (**Figura 18A**). As células dendríticas diferenciadas de animais LFD infectados utilizadas na cultura foram caracterizadas como CD11c⁺ F4/80⁻ CD11b⁺ MHCII⁺ (**Figura 18B**) e os linfócitos isolados quando estimulados apresentaram-se funcionais (**Figura 18C**). A estratégia de gate e controles de fluorescência são apresentadas na **Figura 18D**. Foi observado redução de CD4⁺IFN γ ⁺ em cultura de células dendríticas IL-1 α ^{-/-} sem estímulo e não foi observado o mesmo quando essas células foram estimuladas. Entretanto, observamos que células dendríticas deficientes para IL-1 α quando estimuladas com antígenos de Mtb induziram menor frequência de células CD4⁺ produtoras de IL-17⁺. Além disso, a frequência de células CD4⁺ Ki67⁺ foram reduzidas quando em cultura com células dendríticas deficientes para IL-1 α (**Figura 18E**).

Nosso grupo já demonstrou que a magnitude da produção de IFN- γ e IL-17 provenientes de células CD4⁺ é dependente de células dendríticas CD11c⁺CD103⁺ (Sérgio et al. 2015). Dessa forma, fomos avaliar essas populações nos pulmões de animais IL-1 α ^{-/-} obesos. Foi utilizado a estratégia de gate segundo a **Figura 6A**. Nossos resultados confirmam dados anteriores de que a obesidade não altera a frequência de células dendríticas (**Figura 19A**). Entretanto, animais IL-1 α ^{-/-}-HFD apresentaram aumento na frequência CD11c⁺CD11b⁺ e redução de células CD11c⁺CD103⁺ quando comparados ao grupo controle IL-1 α ^{-/-}- LFD (**Figura 19B-C**). Nossos resultados sugerem que tanto a obesidade quanto a citocina IL-1 α desempenham um papel crucial na diferenciação e no recrutamento das células dendríticas capazes de induzir uma resposta Th17.

Figura 18. Análise da frequência de células CD4⁺IFNγ⁺ e CD4⁺IL-17⁺ em cocultura de células dendríticas de animais IL-1α^{-/-} com células CD4⁺ de animais infectados

O ensaio foi realizado segundo o delineamento experimental (a). Caracterização fenotípica de células dendríticas diferenciadas de precursores de medula óssea de animais LFD infectados (b). Capacidade funcional de linfócitos isolados do baço de animais infectados (c). Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (d). Frequência de células CD4⁺IFNγ⁺, CD4⁺IL-17⁺ e CD4⁺Ki67⁺ (e). Os dados são representativos de um experimento. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

Figura 19. Frequência de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁺ e CD11c⁺CD103⁺ nos animais IL-1α^{-/-} obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (a). Frequência de células CD11c⁺CD11b⁺ (b) e CD11c⁺CD103⁺ (c). Os dados são representativos de um experimento. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.13. Avaliação de monócitos inflamatórios e neutrófilos em animais IL-1 α ^{-/-} obesos

Para melhor caracterizar a resposta imunológica nos animais IL-1 α ^{-/-} obesos nos propuzemos avaliar as populações de monócitos e neutrófilos. A estratégia de gates utilizada foi descrita anteriormente na Figura 7A e 8A. Animais WT-HFD apresentaram redução de monócitos Ly6C^{hi} quando comparados ao grupo WT-LFD. Nossos resultados corroboram com a literatura ressaltando que nosso modelo assemelha-se ao perfil no sangue de pacientes diabéticos (N. P. Kumar et al. 2016). Entretanto, a ausência da citocina IL-1 α regulou positivamente o recrutamento de monócitos no pulmão de animais obesos quando comparados ao grupo WT-HFD (**Figura 20A-B**). Embora a obesidade não tenha afetado o influxo de neutrófilos para os pulmões, ausência de IL-1 α interferiu na frequência de neutrófilos dependente da dieta. Animais IL-1 α ^{-/-}-LFD apresentaram redução de neutrófilos quando comparados ao grupo IL-1 α ^{-/-}-HFD (**Figura 20C-D**).

Figura 20. Avaliação de monócitos inflamatórios e neutrófilos em animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção, os lóbulos mediano e inferior direito foram digeridos. Suspensões celulares foram submetidas ao protocolo de citometria de fluxo. Representativos da análise de citometria de fluxo das populações (a,c) e frequência de células CD11b⁺ Ly6C^{high} (b) e CD11b⁺ Ly6G⁺ (d). Os dados são representativos de um experimento. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

5.14. Análise da microbiota comensal nas fezes de animais IL-1 α obesos

Trabalhos já tem destacado a disbiose como um importante fator no desenvolvimento da diabetes e da obesidade tendo capacidade de alterar sistemicamente o sistema imunológico do indivíduo (Luo et al. 2015). Dessa forma, o desenvolvimento da resposta imunológica e a participação da microbiota durante a obesidade ainda encontra-se em aberto. Portanto nos propuzemos avaliar os principais Filos já descritos serem alterados durante a obesidade. Animais WT-HFD apresentaram aumento dos Filos Bacteroidetes e Firmicutes quando comparados ao grupo controle (WT-LFD) **Figura 21A-B**. Animais IL-1 α ^{-/-}-HFD apresentaram aumento do Filo Bacteroidetes quando comparados ao grupo IL-1 α ^{-/-}-LFD. Entretanto, foi observado redução do Filo Firmicutes nos animais IL-1 α ^{-/-}-HFD quando comparados ao grupo WT-HFD **Figura 21A-B**.

Figura 21. Análise da microbiota comensal nas fezes de animais IL-1 α obesos.

Os animais foram infectados como descrito na figura 2. Vinte e um dias após a infecção as fezes foram coletadas. A partir do DNA fecal foi avaliado a expressão dos Filos Bacteroidetes WT LFD ($n=6$), HFD ($n=8$) e IL-1 α ^{-/-} LFD ($n=9$), HFD ($n=7$) (a) e Firmicutes WT LFD ($n=6$), HFD ($n=7$) e IL-1 α ^{-/-} LFD ($n=9$), HFD ($n=8$) (b). Os dados são representativos de um experimento repetido duas vezes. Barras horizontais e asteriscos mostram a diferença $P < 0,05$ entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

Diversos modelos animais como também resultados coletados a partir de pacientes mostraram que a obesidade afeta de forma sistêmica o corpo, o metabolismo e, consequentemente, o sistema imunológico. Dados mundiais confirmam o aumento na incidência da obesidade na população moderna, inclusive em países de baixa e média renda (BBC Brasil 2017; Ford, Patel, and Narayan 2017). Dessa forma, a desnutrição e o ganho de peso começaram a caminhar conjuntamente (Jeon and Murray 2008). O consumo exagerado de dietas ricas em gordura ou em carboidratos resulta em inflamação sistêmica de baixo grau (metainflamação) e influencia no desenvolvimento de doenças que acometem os pulmões (Dinger et al. 2018), como a pneumonia (Nie et al. 2014), a asma (Kim et al. 2014) e a infecção por influenza (Milner et al. 2015). O estado imunológico de indivíduos obesos destaca-se pela expressão de IL-6, IL-1 β , TNF, CCL2 e acúmulo de macrófagos M1 no tecido adiposo, além do aumento sistêmico de citocinas próinflamatórias (Li et al. 2018; Gökhan S. Hotamisligil 2017).

Resultados presentes na tese da Dra. Sandra Palma mostram que animais obesos, em decorrência da ingestão de dieta hiperlipídica (HFD, *High Fat Diet*), infectados com *M. tuberculosis* foram mais suscetíveis e apresentaram inflamação pulmonar mais intensa quando comparados aos animais não obesos, alimentados com dieta padrão (LFD, *Low Fat Diet*) e infectados. Somado a isso, a análise através de PCR *microarray* dos pulmões desses animais também evidenciou o aumento na expressão gênica de IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , IL-17, além do aumento de IL-1 α e IL-1 β , e aumento de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-17 nos pulmões de animais obesos e infectados.

A diabetes, que está diretamente associada com obesidade, aumenta em três vezes a chance de um indivíduo desenvolver tuberculose (Jeon and Murray 2008). Dados da literatura ressaltam a exacerbação da resposta adaptativa, com aumento de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-17 na comorbidade diabetes e tuberculose comparada aos pacientes com tuberculose, que não têm diabetes (Stevenson et al. 2007; Raposo-García et al. 2017; Restrepo 2016). Países como Bangladesh, Nepal e Índia são exemplos do aumento na incidência de obesidade e diabetes (Balarajan and Villamor 2009). Índia e Coréia do Sul já tem observado o aumento do número de casos de tuberculose associado a diabetes (P.-H. Lee et al. 2018). Além disso, o Brasil também tem reportado aumento na incidência dessa comorbidade (Reis-Santos et al. 2014). Gil-Santana e

colaboradores mostraram em estudo de coorte que pacientes diabéticos apresentaram quadros clínicos mais graves de cavitação pulmonar (Gil-Santana et al. 2016).

Segundo Nathela e Babu, dois mecanismos podem ser relacionados aos casos de diabetes e tuberculose: (I) a desregulação do metabolismo que resulta na hiperglicemia e resistência à insulina, aumentando a replicação do bacilo e, (II) o aumento da inflamação por meio da ativação dos monócitos residentes do tecido adiposo, induzida por ácidos graxos e lipídeos (Kumar Nathella and Babu 2017). Assim, a obesidade que causa inflamação e também pode causar resistência à insulina, pode resultar no desenvolvimento de formas mais graves de tuberculose.

Nossa hipótese era que o aumento de IL-1 β , como consequência da metainflamação induzida pela obesidade, levaria ao aumento da inflamação pulmonar e da suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis*. Pouco se sabe sobre o papel da IL-1 α na obesidade. Para isso, utilizamos como ferramenta animais deficientes para IL-1 α e para o receptor da IL-1 (IL-1R), alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) ou dieta padrão (LFD), seguida da infecção com *M. tuberculosis*. A ausência da sinalização de IL-1R impede a ação das citocinas IL-1 α e IL-1 β , e do antagonista IL-1Ra, enquanto nos animais deficientes para IL-1 α , avaliamos a ação isolada desse mediador. Além disso, animais obesos foram tratados com anticorpo neutralizante para IL-1 β na tentativa de inibir o efeito da IL-1 β quando a obesidade já estivesse estabelecida, enquanto a citocina IL-1 α recombinante foi utilizada para reconstituir o fenótipo dos animais deficientes para IL-1 α quando obesos e durante a infecção.

É importante ressaltar que há apenas um único estudo relacionando tuberculose e obesidade, que empregou camundongos deficientes para leptina (ob/ob) como modelo de obesidade. Esses animais ob/ob infectados com *M. tuberculosis* foram mais suscetíveis e produziram menos IFN- γ que os animais WT infectados (Wieland et al. 2005).

Dados da literatura ressaltam que animais deficientes para o receptor da IL-1 (IL-1R) alimentados com HFD desenvolveram um quadro menor da metainflamação e de intolerância à glicose (McGillicuddy et al. 2011, 2013). Entretanto, nossos resultados mostram que ambos os animais IL-1R^{-/-} e IL-1 α ^{-/-} alimentados com HFD engordaram e apresentaram elevada hiperglicemia. Além disso, os animais deficientes para IL-1R apresentaram-se intolerantes à glicose independente da dieta. Portanto, a ausência do receptor IL-1R foi capaz de interferir na tolerância à glicose, ressaltando a importância da sinalização de IL-1 durante o metabolismo da glicose. Entretanto, a ausência da IL-1 α não interferiu na intolerância à glicose.

Animais IL-1R^{-/-} obesos não foram menos susceptíveis à infecção que os animais WT obesos, como esperávamos. Porém, tiveram redução da inflamação pulmonar comparados ao grupo WT obeso, mostrando que nossa hipótese estava parcialmente correta. Também não foram observadas diferenças nas populações de células dendríticas, macrófagos, monócitos e linfócitos CD4⁺IFN- γ ⁺. Por outro lado, ambos os grupos IL-1R^{-/-} LFD e HFD apresentaram redução das populações de neutrófilos e das células CD4⁺IL-17⁺ quando comparados aos seus respectivos grupos controles. Veerdonk e colaboradores já demonstraram que IL-1 β está fortemente envolvida na indução do perfil Th17 na infecção por *M. tuberculosis*. Ou seja, caspase 1 e proteases, as quais estão envolvidas no processo de clivagem da IL-1 β , são também cruciais para indução do perfil Th17 que é fortemente dependente da sinalização da IL-1 β no receptor IL-1R. Dessa forma, a depleção de IL-1R, culmina na redução do perfil Th17 durante a infecção (van de Veerdonk et al. 2010). Portanto nossos resultados mostram que o eixo IL-1/IL-1R, independente da dieta, é importante para a indução do perfil Th17 no modelo obesidade e TB. Além disso, animais deficientes para IL-1R apresentaram uma redução do recrutamento de neutrófilos. A literatura já ressalta que animais deficientes para IL-17 apresentaram uma redução no recrutamento de neutrófilos para o pulmão (Freches et al. 2013). Dessa forma, ressalta que a ausência da sinalização via IL-1R prejudica a indução de uma resposta Th17 que já é sabidamente envolvida no recrutamento de neutrófilos. Entretanto, o aumento da inflamação pulmonar observado quando comparado os grupos WT-LFD e IL-1R (LFD-HFD) pode ser devido à ausência da sinalização reguladora de IL-1Ra via IL-1R.

Ambas as citocinas IL-1 α e IL-1 β interagem com o receptor IL-1R, todavia, a IL-1 β é crítica durante a metainflamação (Vandanmagsar et al. 2011). Trabalhos da literatura ressaltam que a produção de IL-1 β tem capacidade de alterar a função pulmonar de animais ou indivíduos obesos. Animais obesos desenvolvem hiper-reatividade brônquica dependente da produção de IL-17 via ILC3 (*Type 3 Innate Lymphoid Cells*) e do inflamassoma NLRP3. Os macrófagos produtores de IL-1 β induzidos pela dieta expandem as células ILC3 produtoras de IL-17. Esse efeito foi abolido quando a IL-1 β foi bloqueada (Kim et al. 2014). A função da IL-1 β durante a metainflamação e na indução da intolerância à glicose envolve pelo menos dois mecanismos. Primeiro, a direta inibição da sinalização da insulina nos tecidos pela fosforilação de IRS1 e também a indução indireta da resistência à insulina, promovendo a geração de TNF (Czech 2017; Jager et al. 2007; Stienstra et al. 2010). Provavelmente o aumento da IL-1 β poderia afetar o metabolismo e

consequentemente a suscetibilidade. Trabalho atual já demonstrou que a hiperglicemia acarretou uma disfunção da barreira epitelial no intestino. A permeabilidade observada afetou as mucosas aumentando a susceptibilidade à infecção entérica em animais submetidos a dieta hiperlipídica. Por outro lado, a deleção do GLUT2 especificamente no epitélio intestinal ou a inibição do metabolismo da glicose restauraram a função de barreira e a contenção bacteriana (Thaiss et al. 2018). Portanto, algum tratamento capaz de controlar a hiperglicemia reduziria a susceptibilidade dos animais.

Dessa forma, investigamos a participação isolada dessa citocina no modelo da comorbidade obesidade e TB. Portanto, o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β inibiria os efeitos da citocina sistemicamente e poderia apontar se o seu papel estaria relacionado com o aumento da susceptibilidade nos animais. Segundo nossos dados, observamos que o tratamento durante duas semanas antes da infecção, no período de constatação do aumento do peso dos animais, foi capaz de aumentar a resistência à infecção e reduzir a inflamação pulmonar, demonstrando que a IL-1 β exerce um papel deletério na comorbidade obesidade e tuberculose.

Por outro lado, o grupo de animais obesos quando infectados apresentaram também aumento nos níveis de IL-1 α nos homogenatos de pulmões e no soro. Todavia, não foi observado diferença na expressão no tecido adiposo. Segundo dados da literatura, crianças com diabetes do tipo 1 e elevada hiperglicemia apresentam aumento de IL-1 α , IL-4 e IL-6 persistindo por horas, independente da regulação da glicose no sangue (Rosa et al. 2008). Em jovens com sobrepeso, a produção de IL-1 α foi correlacionada com as concentrações de triglicerídeos, colesterol total e colesterol de baixa densidade (LDL) (C. Jung et al. 2010). Observações a partir de modelos experimentais mostraram que animais obesos apresentaram IL-1 α aumentada no soro e, surpreendentemente, esses animais apresentaram aumento dos níveis de triglicerídeos no sangue 12 horas após a administração de IL-1 α recombinante. Assim, a IL-1 α participa de mecanismos que alteram o metabolismo, mas tais mecanismos ainda não foram plenamente esclarecidos (Um et al. 2011). Durante a obesidade, os adipócitos sofrem hipóxia e necrose, tornando-se um sinal de perigo, e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Portanto, os lipídeos armazenados por essas células são dispersos sistemicamente. Os ácidos graxos dispersos sistemicamente foram capazes de promover a liberação exclusivamente de IL-1 α *in vitro*, demonstrando serem incapazes de induzir a produção de IL-1 β , quando adicionados à cultura de macrófagos estimulados com LPS. Além disso, células do sangue periférico na presença de ácido oleico, linoleico ou

araquidônico produziram exclusivamente IL-1 α (Freigang et al. 2013). Esses dados reforçam que o papel da IL-1 α precisa ser melhor investigado na obesidade.

A ausência da IL-1 α nos animais obesos aumentou a susceptibilidade e a inflamação pulmonar na comorbidade obesidade e tuberculose, reduziu a frequência de células CD4⁺IFN- γ ⁺ e células CD4⁺IL-17⁺ comparando-se com o grupo controle WT obeso. Por outro lado, o tratamento dos animais IL-1 α ^{-/-} obesos com a citocina IL-1 α recombinante aumentou a resistência à infecção e reduziu a inflamação pulmonar. Ainda, o tratamento foi capaz de aumentar a frequência de células CD4⁺IFN- γ e CD4⁺IL-17⁺ nos animais obesos, que estavam reduzidas no grupo IL-1 α ^{-/-} obeso quando comparado com o grupo WT obeso.

A IL-1 α participa da diferenciação de células Th17. Macrófagos que expressam a citocina IL-1 α na membrana foram capazes de aumentar a frequência de células Th17 (Foucher et al. 2015). Apesar do papel ambíguo do perfil Th17 no contexto de proteção durante a infecção com *M. tuberculosis*, no nosso modelo de infecção aguda, o perfil Th17 está associado com proteção, como evidenciado pela correlação inversa entre células CD4⁺IL-17⁺ e número de CFU nos pulmões. O papel protetor da resposta Th17 poderia ser decorrente do recrutamento de células Th1 via CXCL11, CXCL10 e CXCL9 (Khader et al. 2007). Porém, não encontramos correlação entre as células Th1 e carga bacteriana nos pulmões de animais obesos. Além disso, de acordo com nossa hipótese inicial, o aumento de células Th1 decorrente da obesidade seria deletério para a resposta nos pulmões do hospedeiro infectado (P. Kumar 2016).

Assim, o aumento na suscetibilidade dos animais IL-1 α ^{-/-} obesos poderia estar relacionado com a redução na população de DC CD103⁺ nos pulmões, que estão envolvidas com o aumento das populações de células Th17 nos pulmões de animais infectados, como descrito previamente pelo nosso grupo (Sérgio et al. 2015). Em adição, mostramos também que células dendríticas deficientes para IL-1 α induziram uma frequência menor de células Th1 e Th17. Além da população de DC CD103⁺, encontramos redução nas populações de macrófagos CD11c⁺CD11b^{lo}, e aumento de células dendríticas CD11c⁺CD11b⁺ e monócitos.

O aumento na população de monócitos poderia ser decorrente de um efeito de compensação da resposta inflamatória na condição de obesidade na ausência de IL-1 α . De fato, a obesidade pode resultar no processo de “endotoxemia metabólica”, no qual ocorre a liberação de LPS de forma sistêmica em animais obesos. Essa liberação sistêmica pode atingir o microambiente da medula óssea e induzir a produção de CCL2 (C. Shi et al. 2011). Nossos resultados mostram que

macrófagos derivados da medula óssea de animais obesos e infectados, quando estimulados com LPS, produziram maiores concentrações de nitrito e IL-6 quando comparados aos macrófagos de animais magros sob as mesmas condições. Esse resultado mostra que o estresse metabólico afeta o microambiente da medula óssea na comorbidade obesidade e tuberculose. Um estudo já ressaltou que animais alimentados com HFD apresentaram redução da população de células tronco presentes na medula e, conseqüentemente, uma reconstituição deficiente das células tronco hematopoiéticas, apontando que ocorre uma estagnação no ambiente medular, com participação da microbiota nesse processo (Luo et al. 2015). Estudos *in vitro* com de macrófagos derivados de sangue periférico de indivíduos saudáveis e infectados com *M. tuberculosis* em condições hiperglicêmicas mostraram aumento na produção de TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 (Lachmandas et al. 2015). Por outro lado, nós mostramos que macrófagos deficientes para IL-1 α infectados com *M. tuberculosis* secretaram baixas concentrações de IL-1 β comparados aos macrófagos provenientes de animais WT.

A citocina IL-1 α também é importante para a proliferação e aumento da atividade microbicida dos macrófagos. Huaux e colaboradores demonstraram que animais deficientes para IL-1 α apresentaram macrófagos caracterizados como CD11 low , os quais foram menos microbicidas, corroborando com a falha da organização do granuloma no modelo induzido por sílica (Huaux et al. 2015). Avaliando as populações de macrófagos nos pulmões de animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ obesos e infectados, observamos uma redução da população de macrófagos CD11 low (CD11c $^{+}$ CD11 lo), sugerindo que essa população estaria envolvida na organização do granuloma e na contenção do bacilo já que esses animais foram mais susceptíveis à infecção.

Monócitos são células chaves durante a infecção por *M. tuberculosis*, podem se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas possibilitando a apresentação de antígenos ou a secreção de citocinas (Balboa et al. 2016). Evidenciamos que animais obesos e infectados apresentaram uma redução da frequência de monócitos Ly6C $high$ quando comparados aos animais magros e infectados.

Entretanto a deficiência de IL-1 $\alpha^{-/-}$ foi capaz de aumentar a frequência dessas células no pulmão dos animais obesos. Talvez exista um mecanismo de compensação, associado ao aumento de IL-6, TNF, CCL2 ou a participação de mediadores lipídicos. Já foi descrito na literatura que a prostaglandina D₂ (PGD₂) está aumentada durante a condição de obesidade (Spite, Clària, and Serhan 2014). Interessante que as mudanças induzidas pela obesidade na síntese dos mediadores lipídicos permanecem mesmo depois da perda de peso (Hernandez-Carretero et al. 2018). Além

disso, já foi descrito recentemente que o receptor para PGD2 está presente em macrófagos aumentando o recrutamento de neutrófilos para o pulmão (Jandl et al. 2016). Entretanto, o influxo de monócitos para o pulmão dos animais deficientes para IL-1 α não foi associado com proteção já que os animais apresentaram maior susceptibilidade quando comparados aos animais WT obesos, e ambos animais IL-1 $\alpha^{-/-}$ tiveram influxo similar de monócitos.

A comorbidade obesidade e tuberculose também interfere na capacidade dos neutrófilos aumentando o número absoluto dessas células no sangue periférico de pacientes (Andrade et al. 2014). Animais, independente da dieta, não apresentaram diferenças na frequência de neutrófilos nos pulmões. Entretanto animais deficientes para IL-1 α obesos apresentaram um aumento na frequência dessas células no pulmão quando comparados aos animais IL-1 α magros. Os dados parecem ser contraditórios quando comparados com as frequências de células Th17. Entretanto, animais deficientes para IL-1 apresentam aumento de TNF- α induzindo o aumento de IL-8 podendo recrutando neutrófilos (Horai et al. 1998).

Nossos dados anteriores ressaltam que a citocina IL-1 α , durante o modelo de comorbidade obesidade e tuberculose, desempenha um papel associado com a diferenciação de células do perfil Th1 e Th17. Todavia, a microbiota tem sido comprovada desempenhar um papel essencial na indução, competência e atividade do sistema imunológico (Belkaid and Harrison 2017). Evidências recentes têm relacionado participação da microbiota na diferenciação da resposta adaptativa de células Th1, Th17 e Treg durante a obesidade (McPhee and Schertzer 2015). Portanto, a participação da IL-1 α , a disbiose e a disfunção da barreira epitelial também podem influenciar na diferenciação de populações na comorbidade obesidade e tuberculose. A microbiota intestinal exerce um papel fundamental durante a obesidade. Lee e colaboradores já demonstraram que animais HFD são mais susceptíveis à colite experimental. Como esperado o transplante fecal dos animais obesos para os magros foi capaz de transferir a susceptibilidade, mas o tratamento com antibióticos nos animais submetidos a dieta hiperlipídica foi capaz de interromper a progressão da colite experimental. Portanto, os dados sugerem que a dieta induz disbiose além de uma disfunção da barreira do epitélio intestinal (J. C. Lee et al. 2017). Entretanto, não é plenamente compreendido quais comunidades microbianas estariam correlacionadas com o desenvolvimento da obesidade e suas consequências (Dahiya et al. 2017; J. C. Lee et al. 2017).

A microbiota também desempenha papel importante durante a tuberculose. Animais tratados com antibióticos apresentam uma mudança na microbiota intestinal capaz de interferir na

susceptibilidade ao *Mycobacterium tuberculosis* nos pulmões. O estudo ressaltou que a disbiose promoveu o aumento da susceptibilidade evidenciado pelo aumento de células T reguladoras e redução de células T $CD4^+$ $IFN-\gamma^+$. De maneira interessante, a reconstituição da microbiota intestinal através da transferência fezes foi capaz de aumentar a resistência dos animais tratados com antibióticos, reduzindo suscetibilidade. Esse estudo demonstrou pela primeira vez que microrganismos presentes no intestino têm um papel envolvido tanto na susceptibilidade como na resistência à infecção (Khan et al. 2016).

Trabalhos clássicos sobre obesidade e microbiota destacam que a razão Firmicutes sobre Bacteroidetes é proeminente na microbiota intestinal (Cotillard et al. 2013). Nossos dados ressaltam, diferente do que esperado, que animais WT obesos e infectados apresentam aumento tanto do Filo Firmicutes quanto Bacteroidetes. Por outro lado, animais $IL-1\alpha^{-/-}$ obesos apresentaram redução do Filo Firmicutes. O Filo Firmicutes tem sido envolvido tanto na indução do perfil Th1 quanto Th17. O gênero *Clostridium*, Firmicutes, produz o metabólito butirato que já foi mostrado ter envolvimento na indução do perfil Th1 e Th17 (Kespohl et al. 2017). Somado a isso, trabalho recente demonstrou que animais $IL-1\alpha^{-/-}$ foram mais resistentes a colite associado com redução do perfil Th17, além disso, os animais demonstraram uma menor diversidade na composição da microbiota intestinal (Nunberg et al. 2018). Revisões recentes têm evidenciado que mudanças na composição da microbiota no trato respiratório e intestinal tem sido correlacionando com as alterações das respostas do sistema imunológico. Ou seja, o eixo intestino/pulmão é uma via que deve influenciar o risco, prevenção e o tratamento da tuberculose (Gupta, Kumar, and Agrawal 2018).

7. SÍNTESE DOS RESULTADOS

- ✓ A obesidade induz um aumento das citocinas IL-1 α e IL-1 β nos pulmões durante a infecção pelo *M. tuberculosis*;
- ✓ Os animais deficientes para IL-1R ou IL-1 α , independente do fenótipo, tornam-se obesos e hiperglicêmicos;
- ✓ A IL-1 β é mais expressa no tecido adiposo devido à metainflamação, enquanto a IL-1 α está aumentada no soro de animais obesos;
- ✓ As células Th17 são induzidas via IL-1R, independente da dieta;
- ✓ O aumento da IL-1 β tem um papel deletério na comorbidade obesidade e tuberculose;
- ✓ A IL-1 α induz o aumento de células Th17, associada com proteção nos animais obesos, e também células Th1;
- ✓ A obesidade induz disbiose tanto nos animais WT quanto nos animais deficientes para IL-1 α .

8. CONCLUSÃO

O eixo IL-1/IL-1R participa da indução da inflamação pulmonar na comorbidade obesidade e tuberculose e, conseqüentemente, afeta a suscetibilidade à infecção. A IL-1 β está associada com aumento da inflamação pulmonar e da suscetibilidade no modelo de comorbidade, enquanto a IL-1 α desempenha papel protetor, associado a redução da inflamação pulmonar e aumento da resistência à infecção por *M. tuberculosis*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, Rasheed, Anfal Al-Mass, Valerie Atizado, Asma Al-Hubail, Fahad Al-Ghimlas, Monira Al-Arouj, Abdullah Bennakhi, Said Dermime, and Kazem Behbehani. 2012. “Elevated Expression of the Toll like Receptors 2 and 4 in Obese Individuals: Its Significance for Obesity-Induced Inflammation.” *Journal of Inflammation (London, England)* 9 (1): 48. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-48>.
- Andrade, Bruno B., Nathella Pavan Kumar, Rathinam Sridhar, Vaithilingam V. Banurekha, Mohideen S. Jawahar, Thomas B. Nutman, Alan Sher, and Subash Babu. 2014. “Heightened Plasma Levels of Heme Oxygenase-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 as Well as Elevated Peripheral Neutrophil Counts Are Associated With TB-Diabetes Comorbidity.” *Chest* 145 (6): 1244–54. <https://doi.org/10.1378/chest.13-1799>.
- Arranz-Trullén, Javier, Lu Lu, David Pulido, Sanjib Bhakta, and Ester Boix. 2017. “Host Antimicrobial Peptides: The Promise of New Treatment Strategies against Tuberculosis.” *Frontiers in Immunology* 8. Frontiers Media SA: 1499. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01499>.
- Auffray, Cedric, Michael H Sieweke, and Frederic Geissmann. 2009. “Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells.” *Annual Review of Immunology* 27 (1): 669–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>.
- Bafica, Andre, Charles A Scanga, Carl G Feng, Cynthia Leifer, Allen Cheever, and Alan Sher. 2005. “TLR9 Regulates Th1 Responses and Cooperates with TLR2 in Mediating Optimal Resistance to Mycobacterium Tuberculosis.” *The Journal of Experimental Medicine* 202 (12): 1715–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20051782>.
- Balarajan, Yarlani, and Eduardo Villamor. 2009. “Nationally Representative Surveys Show Recent Increases in the Prevalence of Overweight and Obesity among Women of Reproductive Age in Bangladesh, Nepal, and India.” *The Journal of Nutrition* 139 (11): 2139–44. <https://doi.org/10.3945/jn.109.112029>.
- Balboa, Luciana, Denise Kviatcovsky, Pablo Schierloh, Marina García, Silvia de la Barrera, and María del Carmen Sasiain. 2016. “Monocyte-Derived Dendritic Cells Early Exposed to

- Mycobacterium Tuberculosis Induce an Enhanced T Helper 17 Response and Transfer Mycobacterial Antigens.” *International Journal of Medical Microbiology* 306 (7): 541–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.06.004>.
- Ballak, Dov B., Rinke Stienstra, Cees J. Tack, Charles A. Dinarello, and Janna A. van Diepen. 2015. “IL-1 Family Members in the Pathogenesis and Treatment of Metabolic Disease: Focus on Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance.” *Cytokine* 75 (2): 280–90. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.005>.
- BBC Brasil. 2017. “As Razões Da Explosão de Obesidade No Brasil - BBC Brasil.” 2017. <http://www.bbc.com/portuguese/brasil-39625621>.
- Belkaid, Yasmine, and Oliver J. Harrison. 2017. “Homeostatic Immunity and the Microbiota.” *Immunity* 46 (4). Elsevier Inc.: 562–76. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>.
- Berda-Haddad, Yaël, Stéphane Robert, Paul Salers, Leila Zekraoui, Catherine Farnarier, Charles A Dinarello, Françoise Dignat-George, and Gilles Kaplanski. 2011. “Sterile Inflammation of Endothelial Cell-Derived Apoptotic Bodies Is Mediated by Interleukin-1 α .” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (51): 20684–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116848108>.
- Borst, Stephen E. 2004. “The Role of TNF-Alpha in Insulin Resistance.” *Endocrine* 23 (2–3): 177–82. <https://doi.org/10.1385/ENDO:23:2-3:177>.
- Boutagy, Nabil E, Ryan P Mcmillan, Madlyn I Frisard, and Matthew W Hulver. 2016. “Metabolic Endotoxemia with Obesity: Is It Real and Is It Relevant?” *Biochimie* 124: 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.020>.
- Brennan, P.J. 2003. “Structure, Function, and Biogenesis of the Cell Wall of Mycobacterium Tuberculosis.” *Tuberculosis* 83 (1–3): 91–97. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6).
- Cadena, Anthony M., Sarah M. Fortune, and Joanne L. Flynn. 2017. “Heterogeneity in Tuberculosis.” *Nature Reviews Immunology* 17 (11). Nature Publishing Group: 691–702. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.69>.

- Caesar, Robert, Christopher S Reigstad, Helene Kling Bäckhed, Christoph Reinhardt, Maria Ketonen, Gunnel Östergren Lundén, Patrice D Cani, and Fredrik Bäckhed. 2012. “Gut-Derived Lipopolysaccharide Augments Adipose Macrophage Accumulation but Is Not Essential for Impaired Glucose or Insulin Tolerance in Mice.” *Gut* 61 (12). BMJ Publishing Group: 1701–7. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301689>.
- Caruso, A M, N Serbina, E Klein, K Triebold, B R Bloom, and J L Flynn. 1999. “Mice Deficient in CD4 T Cells Have Only Transiently Diminished Levels of IFN-Gamma, yet Succumb to Tuberculosis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162 (9): 5407–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228018>.
- Castro-Garza, Jorge, C Harold King, W Edward Swords, and Frederick D Quinn. 2002. “Demonstration of Spread by Mycobacterium Tuberculosis Bacilli in A549 Epithelial Cell Monolayers.” *FEMS Microbiology Letters* 212 (2): 145–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12113926>.
- Chen, Minjian, Maziar Divangahi, Huixian Gan, Daniel S J Shin, Song Hong, David M Lee, Charles N Serhan, Samuel M Behar, and Heinz G Remold. 2008. “Lipid Mediators in Innate Immunity against Tuberculosis: Opposing Roles of PGE2 and LXA4 in the Induction of Macrophage Death.” *The Journal of Experimental Medicine* 205 (12): 2791–2801. <https://doi.org/10.1084/jem.20080767>.
- Chen, Zheng W. 2013. “Multifunctional Immune Responses of HMBPP-Specific V γ 2V δ 2 T Cells in M. Tuberculosis and Other Infections.” *Cellular & Molecular Immunology* 10 (1): 58–64. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.46>.
- Choudhary, Alok, Deendayal Patel, William Honnen, Zhong Lai, Raja Sekhar Prattipati, Ruixiang Blake Zheng, Ying-Chao Hsueh, et al. 2018. “Characterization of the Antigenic Heterogeneity of Lipoarabinomannan, the Major Surface Glycolipid OfMycobacterium Tuberculosis, and Complexity of Antibody Specificities toward This Antigen.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, April. American Association of Immunologists, j11701673. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701673>.
- Chukwuanukwu, R C, C C Onyenekwe, L Martinez-Pomares, R Flynn, S Singh, G I Amilo, N R

- Agbakoba, and J O Okoye. 2016. “Modulation of the Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis during Malaria/M. Tuberculosis Co-Infection.” *Clinical and Experimental Immunology* 187: 259–268. <https://doi.org/10.1111/cei.12861>.
- Cole, S T, R Brosch, J Parkhill, T Garnier, C Churcher, D Harris, S V Gordon, et al. 1998. “Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence.” *Nature* 393 (6685): 537–44. <https://doi.org/10.1038/31159>.
- Cooper, A M. 2009. “Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis.” *Annu Rev Immunol* 27: 393–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703>.
- 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.” *The Journal of Experimental Medicine* 186 (1): 39–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9206995>.
- Cotillard, Aurélie, Sean P. Kennedy, Ling Chun Kong, Edi Prifti, Nicolas Pons, Emmanuelle Le Chatelier, Mathieu Almeida, et al. 2013. “Dietary Intervention Impact on Gut Microbial Gene Richness.” *Nature* 500 (7464): 585–88. <https://doi.org/10.1038/nature12480>.
- Crevel, Reinout van, Tom H M Ottenhoff, and Jos W M van der Meer. 2003. “Innate Immunity to Mycobacterium Tuberculosis.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 531: 241–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12916796>.
- Cucak, Helena, Lars Groth Grunnet, and Alexander Rosendahl. 2014. “Accumulation of M1-like Macrophages in Type 2 Diabetic Islets Is Followed by a Systemic Shift in Macrophage Polarization.” *Journal of Leukocyte Biology* 95 (1): 149–60. <https://doi.org/10.1189/jlb.0213075>.
- Czech, Michael P. 2017. “Insulin Action and Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes.” *Nature Medicine* 23 (7): 804–14. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>.
- Dahiya, Dinesh K, Renuka, Monica Puniya, Umesh K Shandilya, Tejpal Dhewa, Nikhil Kumar, Sanjeev Kumar, Anil K Puniya, and Pratyosh Shukla. 2017. “Gut Microbiota Modulation and Its Relationship with Obesity Using Prebiotic Fibers and Probiotics: A Review.”

- Frontiers in Microbiology* 8. Frontiers Media SA: 563. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00563>.
- Davis, J. Muse, and Lalita Ramakrishnan. 2009. "The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection." *Cell* 136 (1): 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.014>.
- Dinger, Katharina, Jasmine Mohr, Christina Vohlen, Dharmesh Hirani, Eva Hucklenbruch-Rother, Regina Ensenuer, Jörg Dötsch, and Miguel A. Alejandro Alcazar. 2018. "Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, Measurement of Lung Function, and Fixation of the Lung to Study the Impact of Obesity and Impaired Metabolism on Pulmonary Outcomes." *Journal of Visualized Experiments*, no. 133 (March). <https://doi.org/10.3791/56685>.
- Dittrich, Anna M, Hui-Chen Chen, Lan Xu, Patricia Ranney, Sean Connolly, Timur O Yarovsky, and H Kim Bottomly. 2008. "A New Mechanism for Inhalational Priming: IL-4 Bypasses Innate Immune Signals." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (10): 7307–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981153>.
- Divangahi, Maziar, Serge Mostowy, François Coulombe, Robert Kozak, Loïc Guillot, Frédéric Veyrier, Koichi S Kobayashi, Richard A Flavell, Philippe Gros, and Marcel A Behr. 2008. "NOD2-Deficient Mice Have Impaired Resistance to Mycobacterium Tuberculosis Infection through Defective Innate and Adaptive Immunity." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (10): 7157–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981137>.
- Dorhoi, Anca, and Stefan H E Kaufmann. 2015. "Versatile Myeloid Cell Subsets Contribute to Tuberculosis-Associated Inflammation." *European Journal of Immunology* 45 (8): 2191–2202. <https://doi.org/10.1002/eji.201545493>.
- Feurerer, Markus, Laura Herrero, Daniela Cipolletta, Afia Naaz, Jamie Wong, Ali Nayer, Jongsoon Lee, et al. 2009. "Lean, but Not Obese, Fat Is Enriched for a Unique Population of Regulatory T Cells That Affect Metabolic Parameters." *Nature Medicine* 15 (8): 930–39. <https://doi.org/10.1038/nm.2002>.
- Fieschi, Claire, Stéphanie Dupuis, Emilie Catherinot, Jacqueline Feinberg, Jacinta Bustamante, Adrien Breiman, Frédéric Altare, et al. 2003. "Low Penetrance, Broad Resistance, and

- Favorable Outcome of Interleukin 12 Receptor Beta1 Deficiency: Medical and Immunological Implications.” *The Journal of Experimental Medicine* 197 (4): 527–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591909>.
- Filipe-Santos, Orchidée, Jacinta Bustamante, Ariane Chapgier, Guillaume Vogt, Ludovic de Beaucoudrey, Jacqueline Feinberg, Emmanuelle Jouanguy, et al. 2006. “Inborn Errors of IL-12/23- and IFN-Gamma-Mediated Immunity: Molecular, Cellular, and Clinical Features.” *Seminars in Immunology* 18 (6): 347–61. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.07.010>.
- Fisher-Hoch, Susan P., Christine E. Mathews, and Joseph B. McCormick. 2013. “Obesity, Diabetes and Pneumonia: The Menacing Interface of Non-Communicable and Infectious Diseases.” *Tropical Medicine and International Health* 18 (12): 1510–19. <https://doi.org/10.1111/tmi.12206>.
- Flynn, J L, J Chan, and P L Lin. 2011. “Macrophages and Control of Granulomatous Inflammation in Tuberculosis.” *Mucosal Immunology* 4 (3): 271–78. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.14>.
- 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.” *The Journal of Experimental Medicine* 178 (6): 2249–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504064>.
- 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): 561–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540941>.
- Flynn, Joanne L, and John Chan. 2001. “IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS.” *Annu. Rev. Immunol* 19: 93–129. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.immunol.19.1.93>.
- Ford, Nicole D., Shivani A. Patel, and K.M. Venkat Narayan. 2017. “Obesity in Low- and Middle-Income Countries: Burden, Drivers, and Emerging Challenges.” *Annual Review of Public Health* 38 (1): 145–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031816-044604>.

- Foucher, Etienne D., Simon Blanchard, Laurence Preisser, Philippe Descamps, Norbert Ifrah, Yves Delneste, and Pascale Jeannin. 2015. "IL-34- and M-CSF-Induced Macrophages Switch Memory T Cells into Th17 Cells via Membrane IL-1 α ." *European Journal of Immunology* 45 (4): 1092–1102. <https://doi.org/10.1002/eji.201444606>.
- Freches, Danielle, Hannelie Korf, Olivier Denis, Xavier Havaux, Kris Huygen, and Marta Romano. 2013. "Mice Genetically Inactivated in Interleukin-17A Receptor Are Defective in Long-Term Control of Mycobacterium Tuberculosis Infection." *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/imm.12130>.
- Freigang, Stefan, Franziska Ampenberger, Adrienne Weiss, Thirumala-Devi Kanneganti, Yoichiro Iwakura, Martin Hersberger, and Manfred Kopf. 2013. "Fatty Acid-induced Mitochondrial Uncoupling Elicits Inflammasome-Independent IL-1 α and Sterile Vascular Inflammation in Atherosclerosis." *Nature Immunology* 14 (10): 1045–53. <https://doi.org/10.1038/ni.2704>.
- Fremont, Cecile M, Dieudonné Togbe, Emilie Doz, Stephanie Rose, Virginie Vasseur, Isabelle Maillet, Muazzam Jacobs, Bernhard Ryffel, and Valerie F J Quesniaux. 2007. "IL-1 Receptor-Mediated Signal Is an Essential Component of MyD88-Dependent Innate Response to Mycobacterium Tuberculosis Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (2): 1178–89. <https://doi.org/10.1093/imm.117.2.1178> [pii].
- Fujisaka, Shiho, Isao Usui, Agussalim Bukhari, Masashi Ikutani, Takeshi Oya, Yukiko Kanatani, Koichi Tsuneyama, et al. 2009. "Macrophages in Diet-Induced Obese Mice." *Diabetes* 58 (November): 2574–82. <https://doi.org/10.2337/db08-1475>.
- Gagneux, Sebastien. 2012. "Host-Pathogen Coevolution in Human Tuberculosis." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 367 (1590). The Royal Society: 850–59. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0316>.
- Garlanda, Cecilia, Charles A. Dinarello, and Alberto Mantovani. 2013. "The Interleukin-1 Family: Back to the Future." *Immunity* 39 (6). Elsevier Inc.: 1003–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>.
- Garton, Natalie J, Simon J Waddell, Anna L Sherratt, Su-Min Lee, Rebecca J Smith, Claire Senner,

- Jason Hinds, et al. 2008. “Cytological and Transcript Analyses Reveal Fat and Lazy Persister-Like Bacilli in Tuberculous Sputum.” Edited by Olivier Neyrolles. *PLoS Medicine* 5 (4): e75. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050075>.
- Gil-Santana, Leonardo, Jilson L. Almeida-Junior, Carolina A. M. Oliveira, Lucas S. Hickson, Carla Daltro, Simone Castro, Hardy Kornfeld, Eduardo M. Netto, and Bruno B. Andrade. 2016. “Diabetes Is Associated with Worse Clinical Presentation in Tuberculosis Patients from Brazil: A Retrospective Cohort Study.” *Plos One* 11 (1): e0146876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146876>.
- Global Burden of Disease. 2017. “Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years.” *New England Journal of Medicine* 377 (1). Massachusetts Medical Society: 13–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362>.
- Gold, Marielle C, Stefania Cerri, Susan Smyk-Pearson, Meghan E Cansler, Todd M Vogt, Jacob Delepine, Ervina Winata, et al. 2010. “Human Mucosal Associated Invariant T Cells Detect Bacterially Infected Cells.” Edited by Philippa Marrack. *PLoS Biology* 8 (6): e1000407. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000407>.
- Green, William D., and Melinda A. Beck. 2017. “Obesity Impairs the Adaptive Immune Response to Influenza Virus.” *Annals of the American Thoracic Society* 14 (Supplement_5): S406–9. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201706-447AW>.
- Guler, Reto, Suraj P Parihar, Gunther Spohn, Pål Johansen, Frank Brombacher, and Martin F Bachmann. 2011. “Blocking IL-1a but Not IL-1b Increases Susceptibility to Chronic Mycobacterium Tuberculosis Infection in Mice” 29: 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.045>.
- Gupta, Nancy, Rakesh Kumar, and Babita Agrawal. 2018. “New Players in Immunity to Tuberculosis: The Host Microbiome, Lung Epithelium, and Innate Immune Cells.” *Frontiers in Immunology* 9 (APR): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00709>.
- Gutierrez, Maximiliano G., Sharon S. Master, Sudha B. Singh, Gregory A. Taylor, Maria I. Colombo, and Vojo Deretic. 2004. “Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium Tuberculosis Survival in Infected Macrophages.” *Cell* 119 (6): 753–66.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.038>.

- Hacham, M, S Argov, RM White, S Segal, and RN Apte. 2002. “Different Patterns of Interleukin-1alpha and Interleukin-1beta Expression in Organs of Normal Young and Old Mice.” *European Cytokine Network* 13 (1): 55–65. <http://europepmc.org/abstract/med/11956021>.
- Han, Jonathan M, and Megan K Levings. 2013. “Immune Regulation in Obesity-Associated Adipose Inflammation.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (2): 527–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301035>.
- Harris, James, Sharon S Master, Sergio A De Haro, Monica Delgado, Esteban A Roberts, Jayne C Hope, Joseph Keane, and Vojo Deretic. 2009. “Th1-Th2 Polarisation and Autophagy in the Control of Intracellular Mycobacteria by Macrophages.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128 (1–3): 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.293>.
- He, Cong, Dandan Cheng, Chao Peng, Yanshu Li, and Yin Zhu. 2018. “High-Fat Diet Induces Dysbiosis of Gastric Microbiota Prior to Gut Microbiota in Association With Metabolic Disorders in Mice.” *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00639>.
- Henderson, R A, S C Watkins, and J L Flynn. 1997. “Activation of Human Dendritic Cells Following Infection with Mycobacterium Tuberculosis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (2): 635–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218578>.
- Hernandez-Carretero, A, N Weber, M R La Frano, W Ying, J Lantero Rodriguez, D D Sears, V Wallenius, E Börgeson, J W Newman, and O Osborn. 2018. “Obesity-Induced Changes in Lipid Mediators Persist after Weight Loss.” *International Journal of Obesity* 42 (4): 728–36. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.266>.
- Hernandez-Pando, Rogelio, Hector Orozco, and Diana Aguilar. 2009. “Factors That Deregulate the Protective Immune Response in Tuberculosis.” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 57 (5): 355–67. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0042-9>.
- Hmama, Zakaria, Sandra Peña-Díaz, Sunil Joseph, and Yossef Av-Gay. 2015. “Immuno-evasion and Immunosuppression of the Macrophage by Mycobacterium Tuberculosis.” *Immunological Reviews* 264 (1): 220–32. <https://doi.org/10.1111/imr.12268>.

- Horai, R, M Asano, K Sudo, H Kanuka, M Suzuki, M Nishihara, M Takahashi, and Y Iwakura. 1998. "Production of Mice Deficient in Genes for Interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/Beta, and IL-1 Receptor Antagonist Shows That IL-1beta Is Crucial in Turpentine-Induced Fever Development and Glucocorticoid Secretion." *The Journal of Experimental Medicine* 187 (9). The Rockefeller University Press: 1463–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9565638>.
- Hotamisligil, G S. 2006. "Inflammation and Metabolic Disorders." *Nature* 444 (1476–4687 (Electronic)): 860–67. <https://doi.org/10.1038/nature05485>.
- Hotamisligil, G S, N S Shargill, and B M Spiegelman. 1993. "Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha: Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance." *Science (New York, N.Y.)* 259 (5091): 87–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678183>.
- Hotamisligil, Gökhan S. 2017. "Inflammation, Metaflammation and Immunometabolic Disorders." *Nature* 542 (7640): 177–85. <https://doi.org/10.1038/nature21363>.
- Houstis, Nicholas, Evan D Rosen, and Eric S Lander. 2006. "Reactive Oxygen Species Have a Causal Role in Multiple Forms of Insulin Resistance." *Nature* 440 (7086): 944–48. <https://doi.org/10.1038/nature04634>.
- Huaux, François, Sandra Lo Re, Giulia Giordano, Francine Uwambayinema, Raynal Devosse, Nadtha Panin, Mihaly Palmai-pallag, et al. 2015. "IL-1alpha Induces CD11b Low Alveolar Macrophage Proliferation and Maturation during Granuloma Formation," no. January: 698–709. <https://doi.org/10.1002/path.4487>.
- Huttunen, R, and J Syrjänen. 2012. "Obesity and the Risk and Outcome of Infection." *International Journal of Obesity*, no. May 2012: 333–40. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.62>.
- Jager, Jennifer, Thierry Grémeaux, Mireille Cormont, Yannick Le Marchand-Brustel, and Jean-François Tanti. 2007. "Interleukin-1 β -Induced Insulin Resistance in Adipocytes through Down-Regulation of Insulin Receptor Substrate-1 Expression." *Endocrinology* 148 (1): 241–51. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0692>.
- Jandl, Katharina, Elvira Stacher, Zoltán Bálint, Eva Maria Sturm, Jovana Maric, Miriam

- Peinhaupt, Petra Luschnig, et al. 2016. "Activated Prostaglandin D₂ Receptors on Macrophages Enhance Neutrophil Recruitment into the Lung." *J Allergy Clin Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.012>.
- Jayaraman, Pushpa, and Samuel M. Behar. 2013. "IL-1 β Promotes Antimicrobial Immunity in Macrophages by Regulating TNFR Signaling and Caspase-3 Activation." *The Journal of Immunology* 190: 0–0. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202688>.
- Jeon, Christie Y, and Megan B Murray. 2008. "Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies." Edited by Brian Williams. *PLoS Medicine* 5 (7): e152. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050152>.
- Jiang, Jing, Bingfen Yang, Hongjuan An, Xinjing Wang, Yanhua Liu, Zhihong Cao, Fei Zhai, Ruo Wang, Yan Cao, and Xiaoxing Cheng. 2016. "Mucosal-Associated Invariant T Cells from Patients with Tuberculosis Exhibit Impaired Immune Response." *Journal of Infection* 72 (3): 338–52. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.11.010>.
- Jong, Bouke C de, Philip C Hill, Alex Aiken, Timothy Awine, Martin Antonio, Ifedayo M Adetifa, Dolly J Jackson-Sillah, et al. 2008. "Progression to Active Tuberculosis, but Not Transmission, Varies by Mycobacterium Tuberculosis Lineage in The Gambia." *The Journal of Infectious Diseases* 198 (7). NIH Public Access: 1037–43. <https://doi.org/10.1086/591504>.
- Joosten, Leo A.B., Mihai G. Netea, and Charles A. Dinarello. 2013. "Interleukin-1 β in Innate Inflammation, Autophagy and Immunity." *Seminars in Immunology* 25 (6): 416–24. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.018>.
- Jouanguy, E, S Lamhamedi-Cherradi, F Altare, M C Fondanèche, D Tuerlinckx, S Blanche, J F Emile, et al. 1997. "Partial Interferon-Gamma Receptor 1 Deficiency in a Child with Tuberculoid Bacillus Calmette-Guérin Infection and a Sibling with Clinical Tuberculosis." *The Journal of Clinical Investigation* 100 (11): 2658–64. <https://doi.org/10.1172/JCI119810>.
- Juffermans, N P, S Florquin, L Camoglio, a Verbon, a H Kolk, P Speelman, S J van Deventer, and T van Der Poll. 2000. "Interleukin-1 Signaling Is Essential for Host Defense during Murine Pulmonary Tuberculosis." *The Journal of Infectious Diseases* 182 (3): 902–8. <https://doi.org/10.1086/315771>.

- Jung, Christian, Norbert Gerdes, Michael Fritzenwanger, and Hans Reiner Figulla. 2010. "Circulating Levels of Interleukin-1 Family Cytokines in Overweight Adolescents." *Mediators of Inflammation* 2010 (February). Hindawi: 958403. <https://doi.org/10.1155/2010/958403>.
- Jung, Yu-Jin, Lynn Ryan, Ronald LaCourse, and Robert J North. 2009. "Differences in the Ability to Generate Type 1 T Helper Cells Need Not Determine Differences in the Ability to Resist Mycobacterium Tuberculosis Infection among Mouse Strains." *The Journal of Infectious Diseases* 199 (12): 1790–96. <https://doi.org/10.1086/599092>.
- Kanneganti, Thirumala-Devi, and Vishwa Deep Dixit. 2012. "Immunological Complications of Obesity." *Nature Immunology* 13 (8). Nature Publishing Group: 707–12. <https://doi.org/10.1038/ni.2343>.
- Karlsson, Erik a, and Melinda a Beck. 2010. "The Burden of Obesity on Infectious Disease." *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.) 235 (12): 1412–24. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010227>.
- Kaspersen, Kathrine Agergård, Ole Birger Pedersen, Mikkel Steen Petersen, Henrik Hjalgrim, Klaus Rostgaard, Bjarne Kuno Møller, Cecilie Juul-Sørensen, et al. 2015. "Obesity and Risk of Infection." *Epidemiology* 26 (4): 580–89. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000301>.
- Keane, J, S Gershon, R P Wise, E Mirabile-Levens, J Kasznica, W D Schwieterman, J N Siegel, and M M Braun. 2001. "Tuberculosis Associated with Infliximab, a Tumor Necrosis Factor Alpha-Neutralizing Agent." *The New England Journal of Medicine* 345 (15): 1098–1104. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011110>.
- Kespohl, Meike, Niyati Vachharajani, Maik Luu, Hani Harb, Sabine Pautz, Svenja Wolff, Nina Sillner, et al. 2017. "The Microbial Metabolite Butyrate Induces Expression of Th1-Associated Factors in CD4+T Cells." *Frontiers in Immunology* 8 (AUG): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01036>.
- Khader, Shabaana A, Guy K Bell, John E Pearl, Jeffrey J Fountain, Javier Rangel-Moreno, Garth E Cilley, Fang Shen, et al. 2007. "IL-23 and IL-17 in the Establishment of Protective

- Pulmonary CD4⁺ T Cell Responses after Vaccination and during Mycobacterium Tuberculosis Challenge.” *Nature Immunology* 8 (4): 369–77. <https://doi.org/10.1038/ni1449>.
- Khader, Shabaana A, Santiago Partida-Sanchez, Guy Bell, Dawn M Jelley-Gibbs, Susan Swain, John E Pearl, Nico Ghilardi, Frederic J Desauvage, Frances E Lund, and Andrea M Cooper. 2006. “Interleukin 12p40 Is Required for Dendritic Cell Migration and T Cell Priming after Mycobacterium Tuberculosis Infection.” *The Journal of Experimental Medicine* 203 (7): 1805–15. <https://doi.org/10.1084/jem.20052545>.
- Khan, Nargis, Aurobind Vidyarthi, Sajid Nadeem, Shikha Negi, and Girish Nair. 2016. “Alteration in the Gut Microbiota Provokes Susceptibility to Tuberculosis” 7 (November): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00529>.
- Khodabandehloo, Hadi, Sattar Gorgani-Firuzjaee, Ghodratollah Panahi, and Reza Meshkani. 2016. “Molecular and Cellular Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction.” *Translational Research* 167 (1). Elsevier Inc.: 228–56. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.08.011>.
- Kim, Hye Young, Hyun Jun Lee, Ya Jen Chang, Muriel Pichavant, Stephanie A. Shore, Katherine A. Fitzgerald, Yoichiro Iwakura, et al. 2014. “Interleukin-17-Producing Innate Lymphoid Cells and the NLRP3 Inflammasome Facilitate Obesity-Associated Airway Hyperreactivity.” *Nature Medicine* 20 (1). Nature Publishing Group: 54–61. <https://doi.org/10.1038/nm.3423>.
- Kleinnijenhuis, Johanneke, L. A B Joosten, Frank L. van de Veerdonk, Nigel Savage, Reinout van Crevel, Bart J. Kullberg, Andre van der Ven, et al. 2009. “Transcriptional and Inflammasome-Mediated Pathways for the Induction of IL-1 β Production by Mycobacterium Tuberculosis.” *European Journal of Immunology* 39 (7): 1914–22. <https://doi.org/10.1002/eji.200839115>.
- Kock, Robert. 1885. “The Etiology of Tuberculosis.” *Journal of the American Medical Association* IV (12): 312–16. <https://doi.org/10.1001/jama.1885.02390870004001a>.
- Koh, Vanessa Hui Qi, See Liang Ng, Michelle Lay Teng Ang, Wenwei Lin, Christiane Ruedl, and Sylvie Alonso. 2017. “Role and Contribution of Pulmonary CD103⁺ Dendritic Cells in the Adaptive Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis.” *Tuberculosis* 102 (January):

34–46. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.12.003>.

- Koopman, Werner J H, Leo G J Nijtmans, Cindy E J Dieteren, Peggy Roestenberg, Federica Valsecchi, Jan A M Smeitink, and Peter H G M Willems. 2010. “Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation.” *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (12): 1431–70. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2743>.
- Kristensen, Ines Ackerl, Jens Erik Veirum, Bjarne Kuno Møller, and Mette Christiansen. 2011. “Novel STAT1 Alleles in a Patient with Impaired Resistance to Mycobacteria.” *Journal of Clinical Immunology* 31 (2): 265–71. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9480-8>.
- Kumar Nathella, Pavan, and Subash Babu. 2017. “Influence of Diabetes Mellitus on Immunity to Human Tuberculosis.” *Immunology* 152 (1): 13–24. <https://doi.org/10.1111/imm.12762>.
- Kumar, Nathella Pavan, Kadar Moideen, Shanmugam Sivakumar, Pradeep A Menon, Vijay Viswanathan, Hardy Kornfeld, and Subash Babu. 2016. “Modulation of Dendritic Cell and Monocyte Subsets in Tuberculosis-Diabetes Co-Morbidity upon Standard Tuberculosis Treatment.” *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 101 (December): 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.10.004>.
- Kumar, Pawan. 2016. “Adult Pulmonary Tuberculosis as a Pathological Manifestation of Hyperactive Antimycobacterial Immune Response Background.” *Clinical and Translational Medicine* 5. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0119-0>.
- Labonte, Adam C., Annie-Carole Tosello-Tramont, and Young S. Hahn. 2014. “The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases.” *Molecules and Cells* 37 (4): 275–85. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2374>.
- Lachmandas, Ekta, Corina N A M van den Heuvel, Michelle S M A Damen, Maartje C P Cleophas, Mihai G Netea, and Reinout van Crevel. 2016. “Diabetes Mellitus and Increased Tuberculosis Susceptibility: The Role of Short-Chain Fatty Acids.” *Journal of Diabetes Research* 2016: 6014631. <https://doi.org/10.1155/2016/6014631>.
- Lachmandas, Ekta, Frank Vrieling, Louis G Wilson, Simone A Joosten, Mihai G Netea, Tom H Ottenhoff, and Reinout van Crevel. 2015. “The Effect of Hyperglycaemia on in Vitro

- Cytokine Production and Macrophage Infection with Mycobacterium Tuberculosis.” Edited by Volker Briken. *PloS One* 10 (2): e0117941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117941>.
- Lachmann, Helen J, Isabelle Kone-Paut, Jasmin B Kuemmerle-Deschner, Kieron S Leslie, Eric Hachulla, Pierre Quartier, Xavier Gitton, et al. 2009. “Use of Canakinumab in the Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome.” *The New England Journal of Medicine* 360 (23): 2416–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810787>.
- Ladel, C H, C Blum, A Dreher, K Reifenberg, M Kopf, and S H Kaufmann. 1997. “Lethal Tuberculosis in Interleukin-6-Deficient Mutant Mice.” *Infection and Immunity* 65 (11): 4843–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353074>.
- Lai, Rocky, Mangalakumari Jeyanathan, Sam Afkhami, Anna Zganiacz, Joanne A. Hammill, Yushi Yao, Charu Kaushic, and Zhou Xing. 2018. “CD11b+ Dendritic Cell–Mediated Anti–Mycobacterium Tuberculosis Th1 Activation Is Counterregulated by CD103+ Dendritic Cells via IL-10.” *The Journal of Immunology*, January, ji1701109. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701109>.
- Lee, June Chul, Hae Youn Lee, Tae Kang Kim, Min Soo Kim, Young Mi Park, Jinyoung Kim, Kihyoun Park, et al. 2017. “Obesogenic Diet-Induced Gut Barrier Dysfunction and Pathobiont Expansion Aggravate Experimental Colitis.” *PLoS ONE* 12 (11): 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187515>.
- Lee, P-H., H. Fu, M-R. Lee, M. Magee, and H-H. Lin. 2018. “Tuberculosis and Diabetes in Low and Moderate Tuberculosis Incidence Countries.” *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 22 (1): 7–16. <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0329>.
- Leung, Chi C, Tai H Lam, Wai M Chan, Wing W Yew, Kin S Ho, Gabriel Leung, Wing S Law, Cheuk M Tam, Chi K Chan, and Kwok C Chang. 2007. “Lower Risk of Tuberculosis in Obesity.” *Archives of Internal Medicine* 167 (12): 1297–1304. <https://doi.org/10.1001/archinte.167.12.1297>.
- Li, Chuan, Maria M. Xu, Kepeng Wang, Adam J. Adler, Anthony T. Vella, and Beiyan Zhou. 2018. “Macrophage Polarization and Meta-Inflammation.” *Translational Research* 191. Elsevier Inc.: 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.004>.

- Lin, Hsien-Ho, Chieh-Yin Wu, Chih-Hui Wang, Han Fu, Knut Lönnroth, Yi-Cheng Chang, and Yen-Tsung Huang. 2018. "Clinical Infectious Diseases Association of Obesity, Diabetes, and Risk of Tuberculosis: Two Population-Based Cohorts." *Clinical Infectious Diseases* 66. <https://doi.org/10.1093/cid/cix852>.
- Lin, Philana Ling, and Joanne L Flynn. 2010. "Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (1). NIH Public Access: 15–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903856>.
- Lin, Philana Ling, Christopher B Ford, M Teresa Coleman, Amy J Myers, Richa Gawande, Thomas Ioerger, James Sacchettini, Sarah M Fortune, and JoAnne L Flynn. 2014. "Sterilization of Granulomas Is Common in Active and Latent Tuberculosis despite Within-Host Variability in Bacterial Killing." *Nature Medicine* 20 (1): 75–79. <https://doi.org/10.1038/nm.3412>.
- Liu, Cui Hua, Haiying Liu, and Baoxue Ge. 2017. "Innate Immunity in Tuberculosis: Host Defense vs Pathogen Evasion." *Cellular and Molecular Immunology* 14 (12). Nature Publishing Group: 963–75. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>.
- Lombard, Robin, Emilie Doz, Florence Carreras, Mathieu Epardaud, Yves Le Vern, Dominique Buzoni-Gatel, and Nathalie Winter. 2016. "IL-17RA in Non-Hematopoietic Cells Controls CXCL-1 and 5 Critical to Recruit Neutrophils to the Lung of Mycobacteria-Infected Mice during the Adaptive Immune Response." Edited by Selvakumar Subbian. *PloS One* 11 (2): e0149455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149455>.
- Lönnroth, Knut, Brian G. Williams, Peter Cegielski, and Christopher Dye. 2010. "A Consistent Log-Linear Relationship between Tuberculosis Incidence and Body Mass Index." *International Journal of Epidemiology* 39 (1): 149–55. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp308>.
- Louie, J. K., M. Acosta, M. C. Samuel, R. Schechter, D. J. Vugia, K. Harriman, B. T. Matyas, and California Pandemic (H1N1) Working Group. 2011. "A Novel Risk Factor for a Novel Virus: Obesity and 2009 Pandemic Influenza A (H1N1)." *Clinical Infectious Diseases* 52 (3): 301–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq152>.
- Lowe, David M., Asela K. Bandara, Geoffrey E. Packe, Richard D. Barker, Robert J. Wilkinson,

- Christopher J. Griffiths, and Adrian R. Martineau. 2013. "Neutrophilia Independently Predicts Death in Tuberculosis." *European Respiratory Journal* 42 (6): 1752–57. <https://doi.org/10.1183/09031936.00140913>.
- Lozza, Laura, Maura Farinacci, Marina Bechtle, Manuela Stäber, Ulrike Zedler, Andrea Baiocchi, Franca Del Nonno, and Stefan H E Kaufmann. 2014. "Communication between Human Dendritic Cell Subsets in Tuberculosis: Requirements for Naive CD4(+) T Cell Stimulation." *Frontiers in Immunology* 5 (July): 324. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00324>.
- Lumeng, Carey N, Jennifer L Bodzin, and Alan R Saltiel. 2007. "Obesity Induces a Phenotypic Switch in Adipose Tissue Macrophage Polarization." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 175–84. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>.
- Luo, Yubin, Guang Liang Chen, Nicole Hannemann, Natacha Ipseiz, Gerhard Krönke, Tobias Bäuerle, Luis Munos, Stefan Wirtz, Georg Schett, and Aline Bozec. 2015. "Microbiota from Obese Mice Regulate Hematopoietic Stem Cell Differentiation by Altering the Bone Niche." *Cell Metabolism* 22 (5): 886–94. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.020>.
- Lyadova, Irina V. 2017. "Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way?" *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2017/8619307>.
- Madan, Rajat, and William A Petri. 2015. "Role of Obesity and Adipose Tissue-Derived Cytokine Leptin during Clostridium Difficile Infection." *Anaerobe* 34. Elsevier Ltd: 182–86. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.009>.
- Mancuso, Peter, Jeffrey L Curtis, Christine M Freeman, Marc Peters-Golden, Jason B Weinberg, and Martin G Myers. 2018. "Ablation of the Leptin Receptor in Myeloid Cells Impairs Pulmonary Clearance of Streptococcus Pneumoniae and Alveolar Macrophage Bactericidal Function." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, March, ajplung.00447.2017. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00447.2017>.
- Mayadas, Tanya N, Xavier Cullere, and Clifford A Lowell. 2014. "The Multifaceted Functions of Neutrophils." *Annual Review of Pathology* 9. NIH Public Access: 181–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>.

- Mayer-Barber, K. D., D. L. Barber, K. Shenderov, S. D. White, M. S. Wilson, a. Cheever, D. Kugler, et al. 2010. "Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 Production Is Critical for Host Resistance to Mycobacterium Tuberculosis and Does Not Require TLR Signaling In Vivo." *The Journal of Immunology* 184 (7): 3326–30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904189>.
- Mayer-Barber, Katrin D., Bruno B. Andrade, Daniel L. Barber, Sara Hieny, Carl G. Feng, Patricia Caspar, Sandy Oland, Siamon Gordon, and Alan 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). Elsevier Inc.: 1023–34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.002>.
- Mayer-Barber, Katrin D, Bruno B Andrade, Sandra D Oland, Eduardo P Amaral, Daniel L Barber, Jacqueline Gonzales, Steven C Derrick, et al. 2014a. "Host-Directed Therapy of Tuberculosis Based on Interleukin-1 and Type I Interferon Crosstalk." *Nature* 511 (7507): 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature13489>.
- McGillicuddy, Fiona C., Karen A. Harford, Clare M. Reynolds, Elizabeth Oliver, Mandy Claessens, Kingston H G Mills, and Helen M. Roche. 2011. "Lack of Interleukin-1 Receptor I (IL-1RI) Protects Mice from High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation Coincident with Improved Glucose Homeostasis." *Diabetes* 60 (6): 1688–98. <https://doi.org/10.2337/db10-1278>.
- McGillicuddy, Fiona C, Clare M Reynolds, Orla Finucane, Eilish Coleman, Karen a Harford, Christine Grant, Domenico Sergi, Lynda M Williams, Kingston H G Mills, and Helen M Roche. 2013. "Long-Term Exposure to a High-Fat Diet Results in the Development of Glucose Intolerance and Insulin Resistance in Interleukin-1 Receptor I-Deficient Mice." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 305 (7): E834–44. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00297.2013>.
- McPhee, Joseph B, and Jonathan D Schertzer. 2015. "Immunometabolism of Obesity and Diabetes: Microbiota Link Compartmentalized Immunity in the Gut to Metabolic Tissue Inflammation." *Clinical Science (London, England: 1979)* 129 (12): 1083–96. <https://doi.org/10.1042/CS20150431>.

- Milner, J Justin, Jenny Rebeles, Suraj Dhungana, Delisha A Stewart, Susan C J Sumner, Matthew H Meyers, Peter Mancuso, and Melinda A Beck. 2015. “Obesity Increases Mortality and Modulates the Lung Metabolome during Pandemic H1N1 Influenza Virus Infection in Mice.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (10): 4846–59. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402295>.
- Ministério da Saúde. 2016. “Panorama Da Tuberculose No Brasil : A Mortalidade Em Números
Panorama Da Tuberculose No Brasil : A Mortalidade Em Números.”
- BBC. 2017. “Obesidade Cresce 60% Em Dez Anos No Brasil — Governo Do Brasil.” 2017. <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/04/obesidade-cresce-60-em-dez-anos-no-brasil>.
- Mishra, Arun K, Nicole N Driessen, Ben J Appelmelk, and Gurdyal S Besra. 2011. “Lipoarabinomannan and Related Glycoconjugates: Structure, Biogenesis and Role in Mycobacterium Tuberculosis Physiology and Host-Pathogen Interaction.” *FEMS Microbiology Reviews* 35 (6). Wiley-Blackwell: 1126–57. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00276.x>.
- Mishra, Bibhuti B. 2013. “Nitric Oxide Controls Tuberculosis Immunopathology by Inhibiting NLRP3 Inflammasome-Dependent IL-1 β Processing.” *Nature Immunology* 25 (8): 713–24. <https://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000178>. Endothelial.
- Mishra, Bibhuti B., Rustin R. Lovewell, Andrew J. Olive, Guoliang Zhang, Wenfei Wang, Eliseo Eugenin, Clare M. Smith, et al. 2017. “Nitric Oxide Prevents a Pathogen-Permissive Granulocytic Inflammation during Tuberculosis.” *Nature Microbiology* 2 (May): 17072. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.72>.
- Morais Fonseca, Denise, Rogério Silva Rosada, Marina Oliveira e Paula, Pryscilla Fanini Wowk, Luis Henrique Franco, Edson Garcia Soares, Célio Lopes Silva, and Vânia Luiza Deperon Bonato. 2010. “Experimental Tuberculosis: Designing a Better Model to Test Vaccines against Tuberculosis.” *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 90 (2): 135–42. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.01.005>.
- Nathan, Carl. 2006. “Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities.” *Nature Reviews. Immunology* 6 (3): 173–82. <https://doi.org/10.1038/nri1785>.

- Nicklin, Martin J H, Jenny L Barton, Minh Nguyen, Michael G FitzGerald, Gordon W Duff, and Ken Kornman. 2002. "A Sequence-Based Map of the Nine Genes of the Human Interleukin-1 Cluster." *Genomics* 79 (5): 718–25. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6751>.
- Nie, Wei, Yi Zhang, Sun Jee, Keum Jung, Bing Li, and Qingyu Xiu. 2014. "Obesity Survival Paradox in Pneumonia: A Meta-Analysis." *BMC Medicine* 12 (1). BMC Medicine: 61. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-61>.
- Nikiforou, Maria, Matthew W. Kemp, Rick H. Van Gorp, Masatoshi Saito, John P. Newnham, Niki L. Reynaert, Leon E.W. Janssen, et al. 2016. "Selective IL-1 α Exposure to the Fetal Gut, Lung, and Chorioamnion/Skin Causes Intestinal Inflammatory and Developmental Changes in Fetal Sheep." *Laboratory Investigation* 96 (1). Nature Publishing Group: 69–80. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.127>.
- Nishimura, Satoshi, Ichiro Manabe, Mika Nagasaki, Koji Eto, Hiroshi Yamashita, Mitsuru Ohsugi, Makoto Otsu, et al. 2009. "CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity." *Nature Medicine* 15 (8). Nature Publishing Group: 914–20. <https://doi.org/10.1038/nm.1964>.
- Nunberg, Moran, Nir Werbner, Hadar Neuman, Marina Bersudsky, Alex Braiman, Moshe Ben-Shoshan, Meirav Ben Izhak, et al. 2018. "Interleukin 1 α -Deficient Mice Have an Altered Gut Microbiota Leading to Protection from Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis." *MSystems*, 1–14.
- O'Garra, Anne, Paul S Redford, Finlay W McNab, Chloe I Bloom, Robert J Wilkinson, and Matthew P R Berry. 2013. *The Immune Response in Tuberculosis. Annual Review of Immunology*. Vol. 31. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>.
- O'Neill, L A, and C Greene. 1998. "Signal Transduction Pathways Activated by the IL-1 Receptor Family: Ancient Signaling Machinery in Mammals, Insects, and Plants." *Journal of Leukocyte Biology* 63 (6): 650–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620655>.
- Okamoto Yoshida, Y., M. Umemura, A. Yahagi, R. L. O'Brien, K. Ikuta, K. Kishihara, H. Hara, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki. 2010. "Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung." *The Journal of Immunology*

- 184 (8): 4414–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903332>.
- Ong, Siew-Min, Eva Hadadi, Truong-Minh Dang, Wei-Hseun Yeap, Crystal Tze-Ying Tan, Tze-Pin Ng, Anis Larbi, and Siew-Cheng Wong. 2018. “The Pro-Inflammatory Phenotype of the Human Non-Classical Monocyte Subset Is Attributed to Senescence.” *Cell Death & Disease* 9 (3): 266. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0327-1>.
- Orjalo, A. V., D. Bhaumik, B. K. Gengler, G. K. Scott, and J. Campisi. 2009. “Cell Surface-Bound IL-1 Is an Upstream Regulator of the Senescence-Associated IL-6/IL-8 Cytokine Network.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (40): 17031–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905299106>.
- Ozcan, Umut, Qiong Cao, Erkan Yilmaz, Ann-Hwee Lee, Neal N Iwakoshi, Esra Ozdelen, Gürol Tuncman, Cem Görgün, Laurie H Glimcher, and Gökhan S Hotamisligil. 2004. “Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes.” *Science (New York, N.Y.)* 306 (5695): 457–61. <https://doi.org/10.1126/science.1103160>.
- Paolo, Nelson C. Di, and Dmitry M. Shayakhmetov. 2016. “Interleukin 1 α and the Inflammatory Process.” *Nature Immunology* 17 (8): 906–13. <https://doi.org/10.1038/ni.3503>.
- Papotto, Pedro H, Julie C Ribot, and Bruno Silva-Santos. 2017. “IL-17+ $\gamma\delta$ T Cells as Kick-Starters of Inflammation.” *Nature Immunology* 18 (6): 604–11. <https://doi.org/10.1038/ni.3726>.
- Parkash, Om, Sonali Agrawal, and M. Madhan Kumar. 2015. “T Regulatory Cells: Achilles’ Heel of Mycobacterium Tuberculosis Infection” *Immunologic Research* 62 (3): 386–98. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8654-0>.
- Patsouris, David, Ping-Ping Li, Divya Thapar, Justin Chapman, Jerrold M Olefsky, and Jaap G Neels. 2008. “Ablation of CD11c-Positive Cells Normalizes Insulin Sensitivity in Obese Insulin Resistant Animals.” *Cell Metabolism* 8 (4): 301–9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.015>.
- Paula, Marina Oliveira, Denise Morais Fonseca, Priscilla Fanini Wowk, Ana Flávia Gembre, Paola Fernanda Fedatto, Cássia Alves Sérgio, Célio Lopes Silva, and Vânia Luiza Deperon Bonato. 2011. “Host Genetic Background Affects Regulatory T-Cell Activity That Influences

- the Magnitude of Cellular Immune Response against Mycobacterium Tuberculosis.” *Immunology and Cell Biology* 89 (4): 526–34. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.116>.
- Pavillard, Luis E., Fabiola Marín-Aguilar, Pedro Bullon, and Mario D. Cordero. 2018. “Cardiovascular Diseases, NLRP3 Inflammasome, and Western Dietary Patterns.” *Pharmacological Research* 131 (May). Academic Press: 44–50. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2018.03.018>.
- Pelissari, Daniele Maria, and Fredi Alexander Diaz-Quijano. 2017. “Household Crowding as a Potential Mediator of Socioeconomic Determinants of Tuberculosis Incidence in Brazil.” *PloS One* 12 (4). Public Library of Science: e0176116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176116>.
- Peters, Wendy, Jason G Cyster, Matthias Mack, Detlef Schlöndorff, Andrea J Wolf, Joel D Ernst, and Israel F Charo. 2004. “CCR2-Dependent Trafficking of F4/80dim Macrophages and CD11cdim/Intermediate Dendritic Cells Is Crucial for T Cell Recruitment to Lungs Infected with Mycobacterium Tuberculosis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (12): 7647–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187146>.
- Petrangeli, Elisa, Giuseppe Coroniti, Anna T Brini, Laura de Girolamo, Deborah Stanco, Stefania Niada, Gianfranco Silecchia, et al. 2016. “Hypoxia Promotes the Inflammatory Response and Stemness Features in Visceral Fat Stem Cells From Obese Subjects.” *Journal of Cellular Physiology* 231 (3): 668–79. <https://doi.org/10.1002/jcp.25113>.
- Philips, Jennifer A. 2008. “Mycobacterial Manipulation of Vacuolar Sorting.” *Cellular Microbiology* 10 (12): 2408–15. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01239.x>.
- Pioli, Patricia A, Lehn K Weaver, Todd M Schaefer, Jacqueline A Wright, Charles R Wira, and Paul M Guyre. 2006. “Lipopolysaccharide-Induced IL-1 Beta Production by Human Uterine Macrophages up-Regulates Uterine Epithelial Cell Expression of Human Beta-Defensin 2.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (11): 6647–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709823>.
- Queval, Christophe J, Roland Brosch, and Roxane Simeone. 2017. “The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against Mycobacterium Tuberculosis.” *Frontiers in Microbiology* 8.

Frontiers Media SA: 2284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02284>.

- Radigan, Kathryn A., Luisa Morales-Nebreda, Saul Soberanes, Trevor Nicholson, Recep Nigdelioglu, Takugo Cho, Monica Chi, et al. 2014. "Impaired Clearance of Influenza A Virus in Obese, Leptin Receptor Deficient Mice Is Independent of Leptin Signaling in the Lung Epithelium and Macrophages." *PLoS ONE* 9 (9): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108138>.
- Raposo-García, Sara, José Manuel Guerra-Laso, Silvia García-García, Javier Juan-García, Eduardo López-Fidalgo, Cristina Díez-Tascón, Teresa Nebreda-Mayoral, Ramiro López-Medrano, and Octavio Miguel Rivero-Lezcano. 2017. "Immunological Response to Mycobacterium Tuberculosis Infection in Blood from Type 2 Diabetes Patients." *Immunology Letters* 186. Elsevier B.V.: 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.03.017>.
- Redente, Elizabeth F, David M Higgins, Lori D Dwyer-Nield, Ian M Orme, Mercedes Gonzalez-Juarrero, and Alvin M Malkinson. 2010. "Differential Polarization of Alveolar Macrophages and Bone Marrow-Derived Monocytes Following Chemically and Pathogen-Induced Chronic Lung Inflammation." *Journal of Leukocyte Biology* 88 (1): 159–68. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609378>.
- Redford, P S, P J Murray, and A O'Garra. 2011. "The Role of IL-10 in Immune Regulation during M. Tuberculosis Infection." *Mucosal Immunology* 4 (3): 261–70. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.7>.
- Reeves, P G, F H Nielsen, and G C Fahey. 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." *The Journal of Nutrition* 123 (11): 1939–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312>.
- Reis-Santos, Bárbara, Teresa Gomes, Rodrigo Locatelli, Elizabete R. de Oliveira, Mauro N. Sanchez, Bernardo L. Horta, Lee W. Riley, and Ethel L. Maciel. 2014. "Treatment Outcomes in Tuberculosis Patients with Diabetes: A Polytomous Analysis Using Brazilian Surveillance System." Edited by Delmiro Fernandez-Reyes. *PLoS ONE* 9 (7): e100082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100082>.

- Restrepo, Blanca I. 2016. "Diabetes and Tuberculosis." *Microbiology Spectrum* 4 (6). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0023-2016>.
- Rider, P., Y. Carmi, O. Guttman, A. Braiman, I. Cohen, E. Voronov, M. R. White, C. A. Dinarello, and R. N. Apte. 2011. "IL-1a and IL-1b Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation." *The Journal of Immunology* 187 (9): 4835–43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102048>.
- Ridker, Paul M. 2017. "Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease." *New England Journal of Medicine*, NEJMoa1707914. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>.
- Ridker, Paul M, Brendan M. Everett, Tom Thuren, Jean G. MacFadyen, William H. Chang, Christie Ballantyne, Francisco Fonseca, et al. 2017. "Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease." *New England Journal of Medicine* 377 (12): 1119–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>.
- Ridker, Paul M, Campbell P Howard, Verena Walter, Brendan Everett, Peter Libby, Johannes Hensen, Tom Thuren, and CANTOS Pilot Investigative Group. 2012. "Effects of Interleukin-1 β Inhibition with Canakinumab on Hemoglobin A1c, Lipids, C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Fibrinogen: A Phase IIb Randomized, Placebo-Controlled Trial." *Circulation* 126 (23): 2739–48. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.122556>.
- Roberts, Lawton L, and Cory M Robinson. 2013. "Mycobacterium Tuberculosis Infection of Human Dendritic Cells Decreases Integrin Expression, Adhesion and Migration to Chemokines." *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/imm.12164>.
- Rosa, Jaime S, Rebecca L Flores, Stacy R Oliver, Andria M Pontello, Frank P Zaldivar, and Pietro R Galassetti. 2008. "Sustained IL-1 α , IL-4, and IL-6 Elevations Following Correction of Hyperglycemia in Children with Type 1 Diabetes Mellitus." *Pediatric Diabetes* 9 (1): 9–16. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2007.00243.x>.
- Rothchild, Alissa C, Pushpa Jayaraman, Cláudio Nunes-Alves, and Samuel M Behar. 2014. "INKT Cell Production of GM-CSF Controls Mycobacterium Tuberculosis." *PLoS Pathogens* 10 (1): e1003805. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003805>.

- Ruperto, Nicolino, Hermine I. Brunner, Pierre Quartier, Tamás Constantin, Nico Wulffraat, Gerd Horneff, Riva Brik, et al. 2012. “Two Randomized Trials of Canakinumab in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis.” *New England Journal of Medicine* 367 (25): 2396–2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205099>.
- Russell, David G, Pere-Joan Cardona, Mi-Jeong Kim, Sophie Allain, and Frédéric Altare. 2009. “Foamy Macrophages and the Progression of the Human Tuberculosis Granuloma.” *Nature Immunology* 10 (9): 943–48. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>.
- Sadek, M I, E Sada, Z Toossi, S K Schwander, and E A Rich. 1998. “Chemokines Induced by Infection of Mononuclear Phagocytes with Mycobacteria and Present in Lung Alveoli during Active Pulmonary Tuberculosis.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19 (3): 513–21. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.3.2815>.
- Samstein, Miriam, Heidi A Schreiber, Ingrid M Leiner, Boze Susac, Michael S Glickman, and Eric G Pamer. 2013. “Essential yet Limited Role for CCR2⁺ Inflammatory Monocytes during Mycobacterium Tuberculosis-Specific T Cell Priming.” *ELife* 2 (November): e01086. <https://doi.org/10.7554/eLife.01086>.
- Schaible, U E, S Sturgill-Koszycki, P H Schlesinger, and D G Russell. 1998. “Cytokine Activation Leads to Acidification and Increases Maturation of Mycobacterium Avium-Containing Phagosomes in Murine Macrophages.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (3): 1290–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570546>.
- Schett, Georg, Jean-Michel Dayer, and Bernhard Manger. 2016. “Interleukin-1 Function and Role in Rheumatic Disease.” *Nature Reviews Rheumatology* 12 (1). Nature Publishing Group: 14–24. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.166>.
- Schito, Marco, Giovanni Battista Migliori, Helen A Fletcher, Ruth Mcnerney, Rosella Centis, Lia D ’ambrosio, Matthew Bates, et al. 2015. “Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines.” *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/civ609>.
- Schlesinger, L S. 1996. “Entry of Mycobacterium Tuberculosis into Mononuclear Phagocytes.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 215: 71–96.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791710>.

- Scriba, Thomas J, Anna K Coussens, and Helen A Fletcher. 2017. "Human Immunology of Tuberculosis," 1–24. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0016-2016>.Correspondence.
- Segueni, Noria, Elaine Tritto, Marie-Laure Bourigault, Stéphanie Rose, François Erard, Marc Le Bert, Muazzam Jacobs, et al. 2016. "Controlled Mycobacterium Tuberculosis Infection in Mice under Treatment with Anti-IL-17A or IL-17F Antibodies, in Contrast to TNF α Neutralization." *Scientific Reports* 6 (1): 36923. <https://doi.org/10.1038/srep36923>.
- Sellayah, Dyan, Felino R Cagampang, and Roger D Cox. 2014. "On the Evolutionary Origins of Obesity: A New Hypothesis." *Endocrinology* 155 (5): 1573–88. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2103>.
- Serbina, Natalya V, Ting Jia, Tobias M Hohl, and Eric G Pamer. 2008. "Monocyte-Mediated Defense against Microbial Pathogens." *Annual Review of Immunology* 26 (1): 421–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>.
- Sérgio, Cássia A., Thais B. Bertolini, Ana Flávia Gembre, Rafael Q. Prado, and Vânia L. D. 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): 574–86. <https://doi.org/10.1111/imm.12411>.
- Sha, Shanshan, Xiaoxia Shi, Guoying Deng, Lina Chen, Yi Xin, and Yufang Ma. 2017. "Mycobacterium Tuberculosis Rv1987 Induces Th2 Immune Responses and Enhances Mycobacterium Smegmatis Survival in Mice." *Microbiological Research* 197 (April): 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.004>.
- Shaler, Christopher R., Carly N. Horvath, Mangalakumari Jeyanathan, and Zhou Xing. 2013. "Within the Enemy's Camp: Contribution of the Granuloma to the Dissemination, Persistence and Transmission of Mycobacterium Tuberculosis." *Frontiers in Immunology* 4 (FRB): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00030>.
- Shapouri-Moghaddam, Abbas, Saeed Mohammadian, Hossein Vazini, Mahdi Taghadosi, Seyed-

- Alireza Esmaeili, Fatemeh Mardani, Bita Seifi, Asadollah Mohammadi, Jalil T. Afshari, and Amirhossein Sahebkar. 2018. "Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease." *Journal of Cellular Physiology*, March. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.
- Sharma, N., M. Akkoyunlu, and R. L. Rabin. 2017. "Macrophages-Common Culprit in Obesity and Asthma." *Allergy*, December. <https://doi.org/10.1111/all.13369>.
- Shen, Hongbo, and Zheng W Chen. 2017. "The Crucial Roles of Th17-Related Cytokines/Signal Pathways in M. Tuberculosis Infection." *Cellular and Molecular Immunology*, no. 320. Nature Publishing Group: 1–10. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.128>.
- Shi, Chao, Ting Jia, Simon Mendez-Ferrer, Tobias M. Hohl, Natalya V. Serbina, Lauren Lipuma, Ingrid Leiner, Ming O. Li, Paul S. Frenette, and Eric G. Pamer. 2011. "Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands." *Immunity* 34 (4): 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.016>.
- Shi, Hang, Maia V Kokoeva, Karen Inouye, Iphigenia Tzamelis, Huali Yin, and Jeffrey S Flier. 2006. "TLR4 Links Innate Immunity and Fatty Acid-Induced Insulin Resistance." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (11): 3015–25. <https://doi.org/10.1172/JCI28898>.
- Sims, John E., and Dirk E. Smith. 2010. "The IL-1 Family: Regulators of Immunity." *Nature Reviews Immunology* 10 (2). Nature Publishing Group: 117. <https://doi.org/10.1038/nri2691>.
- Sindhu, Sardar, Nadeem Akhter, Shihab Kochumon, Reeby Thomas, Ajit Wilson, Steve Shenouda, Jaakko Tuomilehto, and Rasheed Ahmad. 2018. "Increased Expression of the Innate Immune Receptor TLR10 in Obesity and Type-2 Diabetes: Association with ROS-Mediated Oxidative Stress." *Cellular Physiology and Biochemistry* 45 (2): 572–90. <https://doi.org/10.1159/000487034>.
- 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): 1236–43. <https://doi.org/10.1093/ajph/137/5/1236> [pii].
- Solana, Rafael, Sian M Henson, Raymond Yung, Dylan Thompson, William Trim, and James E

- Turner. 2018. "Parallels in Immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity." *Front. Immunol* 9 (9). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00169>.
- Song, Xinyang, Xiao He, Xiaoxia Li, and Youcun Qian. 2016. "The Roles and Functional Mechanisms of Interleukin-17 Family Cytokines in Mucosal Immunity." *Cellular & Molecular Immunology* 13 (4): 418–31. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.105>.
- Spencer, Michael, Resat Unal, Beibei Zhu, Neda Rasouli, Robert E McGehee, Charlotte A Peterson, and Philip A Kern. 2011. "Adipose Tissue Extracellular Matrix and Vascular Abnormalities in Obesity and Insulin Resistance." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96 (12): E1990-8. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1567>.
- Spite, Matthew, Joan Clària, and Charles N Serhan. 2014. "Resolvins, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and Their Potential Roles in Metabolic Diseases." *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.006>.
- Stamm, Chelsea E, Angela C Collins, and Michael U Shiloh. 2015. "Sensing of Mycobacterium Tuberculosis and Consequences to Both Host and Bacillus." *Immunological Reviews* 264 (1). NIH Public Access: 204–19. <https://doi.org/10.1111/imr.12263>.
- Steigler, Pia, Naomi J Daniels, Tim R McCulloch, Brin M Ryder, Sarah K Sandford, and Joanna R Kirman. 2018. "BCG Vaccination Drives Accumulation and Effector Function of Innate Lymphoid Cells in Murine Lungs." *Immunology and Cell Biology*, February. <https://doi.org/10.1111/imcb.12007>.
- Stevenson, Catherine R, Nita G Forouhi, Gojka Roglic, Brian G Williams, Jeremy A Lauer, Christopher Dye, and Nigel Unwin. 2007. "Diabetes and Tuberculosis: The Impact of the Diabetes Epidemic on Tuberculosis Incidence." *BMC Public Health* 7 (1): 234. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-7-234>.
- Stienstra, Rinke, Leo A B Joosten, Tim Koenen, Berry Van Tits, Janna A Van Diepen, Sjoerd A A Van Den Berg, Patrick C N Rensen, et al. 2010. "The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity." *Cell Metab.* December 1 (126): 593–605. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.11.011>.

- Strissel, Katherine J, Jason DeFuria, Merav E Shaul, Grace Bennett, Andrew S Greenberg, and Martin S Obin. 2010. "T-Cell Recruitment and Th1 Polarization in Adipose Tissue during Diet-Induced Obesity in C57BL/6 Mice." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 18 (10). Nature Publishing Group: 1918–25. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.1>.
- Sun, Xuerong, Tangbin Zou, Changqing Zuo, Mingmeng Zhang, Benyan Shi, Zhiwen Jiang, Hongjing Cui, et al. 2017. "IL-1 α Inhibits Proliferation and Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells through NF-KB- and ERK1/2- Mediated Proinflammatory Cytokines." *Cell Biology International*, December. <https://doi.org/10.1002/cbin.10932>.
- Sutton, Caroline, Corinna Brereton, Brian Keogh, Kingston H G Mills, and Ed C Lavelle. 2006. "A Crucial Role for Interleukin (IL)-1 in the Induction of IL-17-Producing T Cells That Mediate Autoimmune Encephalomyelitis." *The Journal of Experimental Medicine* 203 (7): 1685–91. <https://doi.org/10.1084/jem.20060285>.
- Tattoli, Ivan, Leticia A Carneiro, Muguette Jéhanno, Joao G Magalhaes, Youmin Shu, Dana J Philpott, Damien Arnoult, and Stephen E Girardin. 2008. "NLRX1 Is a Mitochondrial NOD-like Receptor That Amplifies NF-KappaB and JNK Pathways by Inducing Reactive Oxygen Species Production." *EMBO Reports* 9 (3). European Molecular Biology Organization: 293–300. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401161>.
- Taylor, Scott L, Blair R Renshaw, Kirsten E Garka, Dirk E Smith, and John E Sims. 2002. "Genomic Organization of the Interleukin-1 Locus." *Genomics* 79 (5): 726–33. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6752>.
- Thaiss, Christoph A, Maayan Levy, Inna Grosheva, Danping Zheng, Eliran Soffer, Eran Blacher, Sofia Braverman, et al. 2018. "Hyperglycemia Drives Intestinal Barrier Dysfunction and Risk for Enteric Infection." *Science (New York, N.Y.)* 359 (6382): 1376–83. <https://doi.org/10.1126/science.aar3318>.
- Thomas, Helen E, Rima Darwiche, John A Corbett, and Thomas W H Kay. 2002. "Interleukin-1 plus Gamma-Interferon-Induced Pancreatic Beta-Cell Dysfunction Is Mediated by Beta-Cell Nitric Oxide Production." *Diabetes* 51 (2): 311–16.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812737>.

Thornberry, Nancy A., Herbert G. Bull, Jimmy R. Calaycay, Kevin T. Chapman, Andrew D. Howard, Matthew J. Kostura, Douglas K. Miller, et al. 1992. "A Novel Heterodimeric Cysteine Protease Is Required for Interleukin-1 β Processing in Monocytes." *Nature* 356 (6372): 768–74. <https://doi.org/10.1038/356768a0>.

Tilg, Herbert, and Alexander R Moschen. 2006. "Adipocytokines: Mediators Linking Adipose Tissue, Inflammation and Immunity." *Nature Reviews. Immunology* 6 (10): 772–83. <https://doi.org/10.1038/nri1937>.

Um, Jae-Young, Hong-Kun Rim, Su-Jin Kim, Hye-Lin Kim, and Seung-Heon Hong. 2011. "Functional Polymorphism of IL-1 Alpha and Its Potential Role in Obesity in Humans and Mice." *PloS One* 6 (12). Public Library of Science: e29524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029524>.

United Nations. 2015. "UN Projects World Population to Reach 8.5 Billion by 2030, Driven by Growth in Developing Countries." 2015. <http://www.un.org/sustainabledevelopment/blog/2015/07/un-projects-world-population-to-reach-8-5-billion-by-2030-driven-by-growth-in-developing-countries/>.

Vandanmagsar, Bolormaa, Yun Hee Youm, Anthony Ravussin, Jose E. Galgani, Krisztian Stadler, Randall L. Mynatt, Eric Ravussin, Jacqueline M. Stephens, and Vishwa Deep Dixit. 2011. "The NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance." *Nature Medicine* 17 (2). Nature Publishing Group: 179–89. <https://doi.org/10.1038/nm.2279>.

Vandevijvere, Stefanie, Carson C Chow, Kevin D Hall, and Boyd A Swinburn. 2015. "Increased Food Energy Supply as a Major Driver of the Obesity Epidemic: A Global Analysis." *Bull World Health Organ* 93 (November 2014): 446–56. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2471/BLT.14.150565>.

Veerdonk, F. L. van de, A. C. Teirlinck, J. Kleinnijenhuis, B. J. Kullberg, R. van Crevel, J. W. M. van der Meer, L. A. B. Joosten, and M. G. Netea. 2010. "Mycobacterium Tuberculosis Induces IL-17A Responses through TLR4 and Dectin-1 and Is Critically Dependent on

- Endogenous IL-1.” *Journal of Leukocyte Biology* 88 (2): 227–32. <https://doi.org/10.1189/jlb.0809550>.
- Watanabe, N, and Y Kobayashi. 1994. “Selective Release of a Processed Form of Interleukin 1 Alpha.” *Cytokine* 6 (6): 597–601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7893968>.
- Weisberg, Stuart P, Deborah Hunter, Reid Huber, Jacob Lemieux, Sarah Slaymaker, Kris Vaddi, Israel Charo, Rudolph L Leibel, and Anthony W Ferrante. 2006. “CCR2 Modulates Inflammatory and Metabolic Effects of High-Fat Feeding.” *The Journal of Clinical Investigation* 116 (1): 115–24. <https://doi.org/10.1172/JCI24335>.
- Wensveen, Felix M, Vedrana Jelenčić, Sonja Valentić, Marko Šestan, Tamara Turk Wensveen, Sebastian Theurich, Ariella Glasner, et al. 2015. “NK Cells Link Obesity-Induced Adipose Stress to Inflammation and Insulin Resistance.” *Nature Immunology* 16 (4): 376–85. <https://doi.org/10.1038/ni.3120>.
- Wentworth, John M, Gaetano Naselli, Wendy A Brown, Lisa Doyle, Belinda Phipson, Gordon K Smyth, Martin Wabitsch, Paul E O’Brien, and Leonard C Harrison. 2010. “Pro-Inflammatory CD11c+CD206+ Adipose Tissue Macrophages Are Associated with Insulin Resistance in Human Obesity.” *Diabetes* 59 (7): 1648–56. <https://doi.org/10.2337/db09-0287>.
- WHO. 2017. *Global Tuberculosis Report 2017*. *Who*. <https://doi.org/WHO/HTM/TB/2017.23>.
- WHO. 2018. “WHO | Obesity and Overweight.” *WHO*. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Wieland, Catharina W, Sandrine Florquin, Edward D Chan, Jaklien C Leemans, Sebastiaan Weijer, Annelies Verbon, Giamila Fantuzzi, and Tom van der Poll. 2005. “Pulmonary Mycobacterium Tuberculosis Infection in Leptin-Deficient Ob/Ob Mice.” *International Immunology* 17 (11): 1399–1408. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh317>.
- Winer, Daniel A, Shawn Winer, Lei Shen, Persis P Wadia, Jason Yantha, Geoffrey Paltser, Hubert Tsui, et al. 2011. “B Cells Promote Insulin Resistance through Modulation of T Cells and Production of Pathogenic IgG Antibodies.” *Nature Medicine* 17 (5): 610–17. <https://doi.org/10.1038/nm.2353>.

- Wolf, Andrea J, Ludovic Desvignes, Beth Linas, Niaz Banaiee, Toshiki Tamura, Kiyoshi Takatsu, and Joel D Ernst. 2008. "Initiation of the Adaptive Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis Depends on Antigen Production in the Local Lymph Node, Not the Lungs." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (1): 105–15. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>.
- Wolf, Andrea J, Beth Linas, Giralina J Trevejo-Nuñez, Eleanor Kincaid, Toshiki Tamura, Kiyoshi Takatsu, and Joel D Ernst. 2007. "Mycobacterium Tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function in Vivo." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (4): 2509–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675513>.
- Woo, Minjeong, Connor Wood, Doyoon Kwon, Kyu-Ho Paul Park, György Fejer, and Vincent Delorme. 2018. "Mycobacterium Tuberculosis Infection and Innate Responses in a New Model of Lung Alveolar Macrophages." *Frontiers in Immunology* 9 (March): 438. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00438>.
- Wu, C, J Ferrante, M K Gately, and J Magram. 1997. "Characterization of IL-12 Receptor Beta1 Chain (IL-12Rbeta1)-Deficient Mice: IL-12Rbeta1 Is an Essential Component of the Functional Mouse IL-12 Receptor." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (4). American Association of Immunologists: 1658–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9257825>.
- Yamada, H, S Mizumo, R Horai, Y Iwakura, and I Sugawara. 2000. "Protective Role of Interleukin-1 in Mycobacterial Infection in IL-1 Alpha/Beta Double-Knockout Mice." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80 (5): 759–67. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780079>.
- Ye, Jianping, Zhanguo Gao, Jun Yin, and Qing He. 2007. "Hypoxia Is a Potential Risk Factor for Chronic Inflammation and Adiponectin Reduction in Adipose Tissue of Ob/Ob and Dietary Obese Mice." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293 (4): E1118–28. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00435.2007>.
- Yen, Yung-Feng. 2016. "Mycobacterium Tuberculosis Cell Wall Fragments Released upon Bacterial Contact with the Human Lung Mucosa Alter the Neutrophil Response to Infection" 95 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002300>.

- Yoshioka, Yuya, Tatsuaki Mizutani, Satoshi Mizuta, Ayumi Miyamoto, Satoru Murata, Toshiaki Ano, Hiroshi Ichise, et al. 2016. “Neutrophils and the S100A9 Protein Critically Regulate Granuloma Formation.” *Blood Advances* 1 (3). American Society of Hematology: 184–92. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000497>.
- Żelechowska, P., J. Agier, E. Kozłowska, and E. Brzezińska-Błaszczuk. 2018. “Mast Cells Participate in Chronic Low-Grade Inflammation within Adipose Tissue.” *Obesity Reviews*, January. <https://doi.org/10.1111/obr.12670>.
- Zeyda, M, D Farmer, J Todoric, O Aszmann, M Speiser, G Györi, G J Zlabinger, and T M Stulnig. 2007. “Human Adipose Tissue Macrophages Are of an Anti-Inflammatory Phenotype but Capable of Excessive pro-Inflammatory Mediator Production.” *International Journal of Obesity* (2005) 31 (9): 1420–28. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803632>.

10. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

FMRP
65 anos USP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Avaliação da função da IL-1 na magnitude da inflamação pulmonar decorrente da obesidade na tuberculose experimental*”, registrado com o número **91/2017**, sob a responsabilidade do **Profa. Dra. Vania Luiza Deperon Bonato Martins**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de outubro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 100 camundongos C57Bl/6 fêmeas pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 50 camundongos IL-1R KO fêmeas pesando 20g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 50 camundongos IL-1 alfa KO fêmeas pesando 20g oriundos do Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular. Vigência da autorização: 30/10/2017 a 17/12/2019.

We certify that the Protocol nº 91/2017, entitled “*IL-1 function evaluation on the magnitude of lung inflammation resulting from obesity in experimental tuberculosis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/30/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 100 female C57Bl/6 mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirao Preto Medical School, 50 female IL-1R KO mice weighing 20g from the Animal House for Special Mice Breeding of Ribeirao Preto Medical School, and 50 female IL-1 alfa KO mice weighing 20g from the Animal House of the Department of Cellular and Molecular Biology of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/17/2019.

Ribeirão Preto, 30 de outubro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA-FMRP – USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br