

Universidade Federal de Juiz de Fora

Instituto de Ciências Biológicas

**Gabriel Santos Cruz Rodrigues**

**Papel da obesidade na imunomodulação da infecção  
experimental por *Mycobacterium bovis* BCG**

Juiz de Fora

2014

**Gabriel Santos Cruz Rodrigues**

**Papel da obesidade na imunomodulação da infecção  
experimental por *Mycobacterium bovis* BCG**

Dissertação de Mestrado do Curso  
de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Área: Imunologia e  
Doenças Infecto Parasitárias, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Biológicas: Área:  
Imunologia e Doenças Infecto  
Parasitárias

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Heloísa D'Avila da Silva Bizarro**

**Juiz de Fora**

**2014**

RODRIGUES, G.S.C. Papel da obesidade na imunomodulação da infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG (2014). Dissertação de mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas , Universidade Federal de Juiz de Fora

**Gabriel Santos Cruz Rodrigues**

**Papel da obesidade na imunomodulação da infecção  
experimental por *Mycobacterium bovis* BCG**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> . Clarissa Menezes Maya Monteiro – **Fiocruz – RJ**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> . Ana Eliza Andreazzi – **UFJF- MG**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Heloísa D'Avila da Silva Bizarro – **UFJF – MG**

**Juiz de Fora**

**2014**

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer primeiramente à Universidade Federal de Juiz de Fora e a Pós Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de desenvolvimento do meu mestrado. Gostaria também de agradecer as agências de fomento que forneceram financiamento a todo meu trabalho.

Diversas pessoas participaram ativamente dessa importante etapa da minha vida e merecem um agradecimento formal. Pessoas que, de suas maneiras, facilitaram esse caminho, tornaram esses dois anos mais leves e partilham comigo desta conquista.

Gostaria de agradecer à minha família, que sempre representou uma fundação firme para meu crescimento, ajudou em minhas escolhas e sempre esteve presente nos momentos mais incertos. Gostaria de agradecê-los por escutarem minhas reclamações, aturarem meu mau humor vindo as vezes do cansaço por experimentos longos de 12 horas ou mais, compreender que natal, ano novo e feriados também são dias de cuidar de animais, fazer experimentos ou as vezes limpar a bagunça do dia anterior e mesmo assim nunca deixar de me apoiar.

Gostaria de agradecer a minha namorada, que conheci no mesmo momento em que entrava no mestrado e que esta ao meu lado desde o início desta jornada, também dando apoio, me escutando, as vezes até sofrendo comigo, porém sempre compreensiva, aceitando um namorado cansado nas sextas feiras, que não tem férias certas e que não consegue deixar de comentar sobre experimentos que não dão certos ou outras complicações. E também aos amigos, uns mais antigos, desde a época de colégio, outros mais recentes, que dão força, acrescentam risadas e boas histórias nesse caminho.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Heloísa, que me acolheu ainda na graduação, como um aluno de IC que não sabia nada, não tinha nenhuma experiência prática e me ensinou tudo que eu precisei ao longo desse tempo para chegar a este momento. Uma pessoa de competência e paciência raras, que consegue extrair de mim o meu melhor e que esteve

sempre proposta a ajudar, discutir, ensinar e que, sem ela, com certeza não estaria hoje objetivando este título de mestre.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram com meu mestrado, as professoras Jacy Gameiro , Ana Eliza Andreazzi e Patrícia Elaine de Almeida , por auxiliarem no desenvolvimento e no andamento do meu projeto e estarem sempre abertas para ajudar quando precisei. A turma da imuno que por muitas vezes emprestou reagentes, tirou dúvidas, disponibilizou espaço, em especial ao Alexandre, da minha turma de mestrado, amigo da época de disciplina na graduação e que nunca deixou de me “socorrer” quando precisei. Agradecer também a turma da fisiologia, que ajudou em experimentos e compartilhou um pouco desse caminho comigo. E também a todas as outras pessoas que ajudaram emprestando equipamentos, pipetadoras, gaiolas ou participaram do arranjo de salas e instalação de equipamentos.

E por último, mas sem dúvida nenhuma, não menos importante, gostaria de agradecer a toda turma do laboratório de biologia celular, que viveu comigo o meu dia a dia neste período, teve paciência, deu dicas e contribuiu para o meu crescimento dentro de um laboratório e por muitas vezes “quebrou aquele galho” que com certeza fez tudo isso acontecer. Dentre estes, seria injusto da minha parte não destacar a participação do meu grupo de pesquisa, dos alunos de IC Douglas e Aline e do doutorando Daniel, pois sem eles não teria feito nem uma pequena parte de tudo que realizei durante meu mestrado. Foram eles que fizeram experimentos noite a dentro, foram na faculdade sábado e domingo, compartilharam da rotina de trato dos animais, dividiram quartos de hotel durante congressos e com uma competência e eficiência notória, me ajudaram a fazer isso acontecer. Sem dúvida essa conquista é tão deles quanto minha.

A todos, o meu muito obrigado,

Gabriel

## Resumo

A obesidade é um grande problema de saúde mundial e com os hábitos e estilos de vidas atuais a sua importância social só tende a crescer. Hoje associa-se a obesidade com o mau prognóstico de diversas doenças, como câncer, diabetes e doenças auto-imune brandas, além disso, ela também está associada a uma resposta imune deficitária frente a infecções por diversos patógenos, como alguns vírus e bactérias. A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa, mais comumente pulmonar, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ou bacilo de Koch) e outros membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta doença causa cerca de 1,4 milhões de morte ao ano, sendo constatados cerca de 8 milhões de novos casos ao ano, estando apenas atrás da AIDS na taxa de mortalidade por doenças infecciosas e seu sucesso se deve em parte à capacidade de viver de meses à décadas no hospedeiro, em estado assintomático. Neste trabalho, avaliamos a relação entre a obesidade e o desenvolvimento da tuberculose, através do modelo de infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos C57/BL6 controles e tratados com dieta hiperglicídica. Os resultados demonstraram que os animais obesos apresentaram um menor recrutamento leucocitário, dentre estes, menor influxo de neutrófilos e eosinófilos. Além disso, animais obesos apresentaram menor formação de corpúsculos lipídicos, menor produção de PGE<sub>2</sub>, maior produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e adiponectina, e menor produção de mediadores pró-inflamatórios, como leptina, em comparação aos animais controles. De maneira geral, nossos resultados apontam que a obesidade induz um perfil mais anti-inflamatório, inibindo a expressão de fatores de favorecimento do patógeno, como a formação de corpúsculos lipídicos, PGE<sub>2</sub> e eosinofilia, sugerindo que a obesidade, nos estágios iniciais de infecção, pode modular negativamente a resposta inflamatória induzida pela infecção micobacteriana.

## Abstract

Obesity is a huge world health problem and with the habits and lifestyles of these days, it's important only tend to grown. Today obesity is associated with a bad prognosis of a large number of diseases , like cancer, diabetes and light self-immune diseases, and besides that, its also associated with an uncompleted response to several pathogens, like some virus and bacteria. The tuberculosis is an infect-contagious disease, commonly pulmonary, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (or, Koch bacillus), and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. This illness cause about 1,4 million deaths per year, being registered 8 million new cases per year, being only behind AIDS on the mortality ratio by infectious diseases in the world and ur success can be related to your capacity to live from months to decades on the host , in a asymptomatic state. In this work, we evaluated the relationship between the obesity and the development of tuberculosis, by using the experimental infection model by *Mycobacterium bovis* BCG. C57/BL6 mice, male, with about 4 to 6 weeks of life, had being fed with standard ration (control group) or hiperglicidic ration (obese group), for 0, 2 or 3 months. The body weight was monitored during this period, and the fat gain and glucose tolerance was measured at the end, so the state of obesity could be characterized. At the end of these periods, this animals received a intraperitoneal inoculation of 100 mL of saline solution (infection control) or 100 mL of BCG solution (infected group) and characteristic processes of this infection were observed, like leukocitary recruitment , lipid bodies formation on these cells, the production of pro and anti-inflammatory cytokines, eicosanoids (PGE<sub>2</sub>) and adipokines. Was observed then, that the obese animals, presented a lower leukocitary recruitment , among then, less influx of neutrophils and eosinophils, lower formation of lipid bodies and production of PGE<sub>2</sub> , higher production of anti-inflammatory mediators (IL-10 and adipokine) and lower production of pro-inflammatory mediators (leptin) . Overall , our data points to a more anti-inflammatory profile on the obese animals , occurring in a minor expression of factors that are important to the pathogen survival , like the formation of lipid bodies and eosinophilia , indicating that, the obesity, on the early stages of the infection, may be representing a disadvantaging factor to the disease.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Incidência dos novos casos de tuberculose para a cada 100 mil habitantes (OMS 2013). .....	15
<b>Figura 2:</b> Corpúsculos lipídicos em leucócitos pleurais durante infecção por BCG, após coloração com tetróxido de ósmio. Macrófago <i>espumoso</i> de granuloma tuberculoso (direita). .....	22
<b>Figura 3:</b> Evolução do número de pessoas obesas e em sobrepeso no Brasil de 1989 a 2009. ....	25
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do delineamento experimental. ....	33
<b>Figura 5:</b> Demonstração da localização das gorduras retroperitoneal (A) e perigonadal (B) .....	36
<b>Figura 6:</b> Controle do ganho de peso dos animais ao longo do período experimental.....	41
<b>Figura 7:</b> Peso final dos animais em tempo zero, em dieta controle e em dieta hiperglicídica. ....	42
<b>Figura 8:</b> Acúmulo de gordura nas regiões perigonadal e retroperitoneal de animais em tempo zero, dieta controle e dieta especial.....	44
<b>Figura 9:</b> Área ob a curva da curva glicêmica realizada em jejum de 12 horas dos animais em tempo zero, em dieta controle e dieta hiperglicídica. ....	45
<b>Figura 10:</b> Diminuição da tolerância à glicose com aumento de glicemia em animais em dieta controlada. ....	46

<b>Figura 11:</b> Migração de leucócitos para a cavidade pleural de animais To, magros e obesos após 24h de infecção por BCG. ....	49
<b>Figura 12:</b> Migração de leucócitos para a cavidade pleural de animais To, magros e obesos após 24h de infecção por BCG .....	51
<b>Figura 13:</b> Recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção no animais controles e infectados. ....	53
<b>Figura 14:</b> Formação de corpúsculos lipídicos frente à infecção por <i>Mycobacterium bovis</i> BCG em animais, T0, magros e obesos. ....	55
<b>Figura 15:</b> Quantificação da produção de prostaglandina E <sub>2</sub> no lavado pleural .....	57
<b>Figura 16:</b> Quantificação da produção de citocinas no lavado pleural após 24h de infecção .....	59
<b>Figura 17:</b> Quantificação da produção de leptina no lavado pleural. ....	61
<b>Figura 18:</b> Quantificação da produção de adiponectina no lavado pleural. ....	62
<b>Tabela 1:</b> Composição da dieta hiperglicídica descrita. ....	32

## Lista de abreviaturas

AA – Ácido Araquidônico

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

GM-CSF – “Granulocyte macrophage colony-stimulating factor” – Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos

IL-1 – “Interleukin 1” – Interleucina 1

IL-10 “Interleukin 10” – Interleucina 10

IL-17 “Interleukin 17” – Interleucina 17

IL-3 “Interleukin 3” – Interleucina 3

IL-4 – “Interleukin 4” - Interleucina 4

IL-5 “Interleukin 5” – Interleucina 5

IL-6 - “Interleukin 2” – Interleucina 6

IMC – Índice de massa corporal

IFN- $\gamma$  - “Interferon gamma” – Interferon gama

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

kDa – Kilodaltons

NK – “Natural Killer” – Células exterminadoras naturais

OMS – Organização mundial de saúde

PAMPs – Padrões Moleculares associados à patógenos

PGE<sub>2</sub> – “Prostaglandina E<sub>2</sub>

TGF-B “Transforming growth factor beta’ – Fator transformador de crescimento beta

Th 17 – “T helper 17” – T auxiliar 17

Th1 – “T Helper 1” – T auxiliar 1

Th2 – “T Helper 2” – T auxiliar 2

TLR – “Toll Like Receptor” – Receptor do tipo Toll

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	Tuberculose.....	15
1.2	Resposta inflamatória na tuberculose .....	16
1.3	Corpúsculos lipídicos e prostaglandina e2 .....	20
1.3.1	Corpúsculos lipídicos e a tuberculose .....	23
1.3.2	Obesidade e doenças infecciosas.....	25
1.3.3	Obesidade e a tuberculose.....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2.1	Objetivo geral .....	30
2.2	objetivos específicos .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAIS e MÉTODOS</b> .....	31
3.1	Animais.....	31
3.2	Dieta e indução do modelo de obesidade .....	31
3.3	Delineamento Experimental .....	32
3.4	Infecção.....	33
3.5	Curva Glicêmica .....	33
3.6	Eutanásia e lavado pleural .....	34
3.7	Extração do tecido adiposo .....	34
3.8	Contagem do influxo de leucócitos para cavidade pleural.....	35
3.9	Contagem de corpúsculos lipídicos .....	35
3.10	PROCESSAMENTO DO LAVADO PLEURAL .....	36
3.11	DOSAGEM DE CITOCINAS E ADIPOCINAS .....	37
3.12	Dosagem de PGE <sub>2</sub> .....	38
3.13	Processamento das imagens .....	38
3.14	Montagem dos gráficos e análise estatística.....	38

<b>4 RESULTADOS</b> .....	40
4.1 Efeito da dieta hiperglicídica no ganho de peso em camundongos c57/bl6 .....	40
4.2 Dieta hiperglicídica induziu ganho de gordura retroperitoneal e perigonadal. .....	43
4.3 A migração de leucócitos para o sítio inflamatório, frente a infecção por <i>mycobacterium bovis bcg</i> , é reduzida em animais obesos .....	47
4.4 A formação de corpúsculos lipídicos frente a infecção por <i>mycobacterium bovis bcg</i> é reduzida em animais obesos.....	54
4.5 Animais obesos apresentam menor produção de prostaglandina e2 frente à infecção por <i>Mycobacterium bovis</i> .....	56
4.6 Durante infecção, animais obesos mesma produção de tnf- $\alpha$ que animais magros, porem maior produção de il-10.....	58
4.7 Animais obesos apresentam uma menor produção de leptina e uma maior produção de adiponectina frente à infecção por <i>Mycobacterium bovis</i> .....	60
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	72

# 1. Introdução

## 1.1 - Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa, mais comumente pulmonar, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ou bacilo de Koch) e outros membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que inclui *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum* (FRIEDEN et. al, 2003 ; FARHAT et al 2013). Esta doença causa cerca de 1,4 milhões de morte ao ano, sendo constatados cerca de 8 milhões de novos casos ao ano (Figura 1), estando apenas atrás da AIDS na taxa de mortalidade por doenças infecciosas, (OMS) e seu sucesso se deve em parte à capacidade de viver de meses à décadas no hospedeiro, em estado assintomático (GALAGAN et al 2013). A proliferação de variedades letais e resistentes a múltiplas drogas fez a OMS pedir agilidade na pesquisa para novas drogas e tratamentos alternativos para a tuberculose, bem como um aumento no investimento em tais pesquisas de cerca de 1,6 bilhões de dólares (OMS).

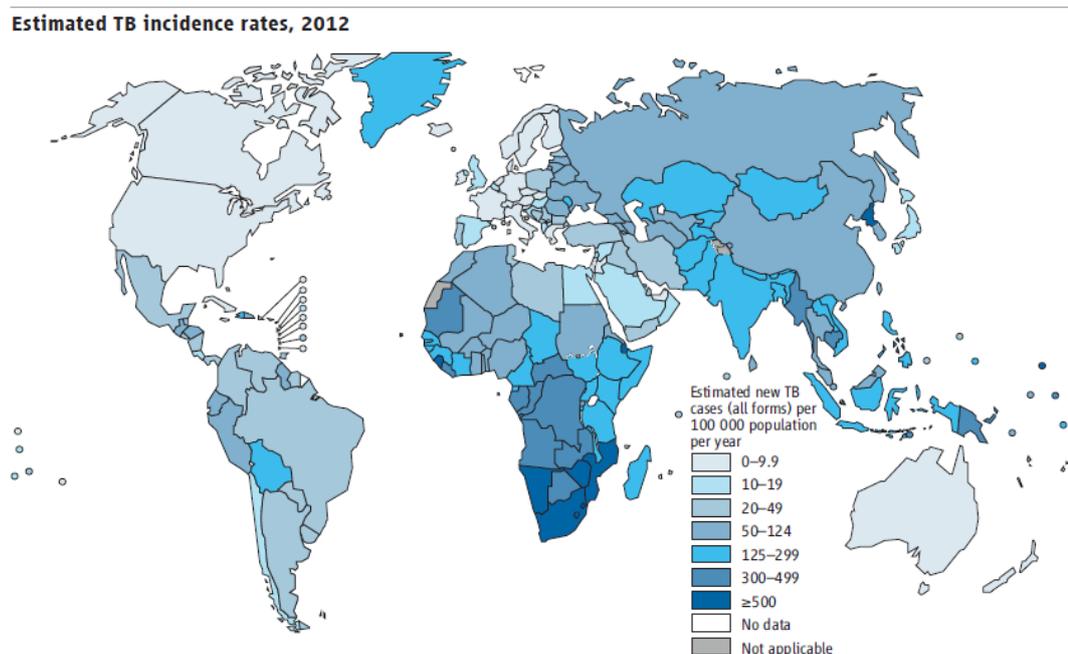


Figura 1: Incidência dos novos casos de tuberculose para a cada 100 mil habitantes (OMS 2013).

A tuberculose apresenta algumas peculiaridades que tornam o tratamento complicado e favorecem o surgimento de variedades resistentes. Hoje sua cura ainda é lenta, levando cerca de 6 meses de tratamento com vários antibióticos, o que leva a uma grande taxa de abandono do tratamento em estágios iniciais (CLIFF et al, 2013; GUPTA et al 2013). Esse fato, associado ao uso excessivo ou equivocado de antibióticos favorecem tanto a proliferação do patógeno, quanto a resistência dos pacientes aos tratamentos usados atualmente (CLIFF et al, 2013; GUPTA et al 2013). De fato, estimativas da Organização Mundial de Saúde apontam para cerca de quase 500 mil casos de tuberculose causados por bacilos resistente à múltiplas drogas, e outros casos mais raros causados por bacilos resistentes a praticamente todas as drogas atualmente utilizadas (CAMPBELL et al 2011). O tratamento nestes casos é bastante complicado devido á ineficiência da primeira linha de antibióticos, sendo necessário o uso de outros medicamentos muito mais caros e com efeitos colaterais mais agressivos (CAMPBELL et al 2011). Por isso torna-se necessário e essencial o desenvolvimento de métodos mais eficazes de tratamento para a tuberculose (OMS).

## **1.2 – Resposta inflamatória na tuberculose**

As bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* são bacilos álcool ácido resistentes, parasitas intracelulares, capazes de se replicar no interior de fagossomas, e aeróbicos (KAPOOR *at al*, 2013). A contaminação ocorre pelas vias aéreas e o patógeno se localiza nos alvéolos pulmonares aonde é fagocitado por macrófagos residente em um processo iniciado quando a bactéria é reconhecida por diferentes receptores, como os receptores de manose, receptores do tipo Toll (TLR), receptores de complemento e etc. Através da estimulação de receptores TLR-2 pela lipo proteína 19-kDa ocorre a redução da expressão do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC-I)

e da apresentação de antígenos bacterianos pelo MHC II (ERNST, 2012). Com isso, macrófagos atraem, pela produção de quimiocinas, monócitos, linfócitos e neutrófilos inativados que não são eficientes em eliminar a bactéria. Começa então a se formar lesões granulomatosas formadas de células gigantes derivadas de macrófagos, chamados de macrófagos espumosos, que decorrem de um acúmulo de lipídios intracelular, armazenados em corpúsculos lipídicos desses macrófagos e de outros tipos de leucócitos (ERNST, 2012; CARDONA et al, 2000). Conforme a resposta imunológica se desenvolve, células contendo o *Mycobacterium tuberculosis* são mortas, formando áreas com granulomas envoltas por fibroblastos, levando a fibrose do tecido infectado. Este processo leva a perda de função do tecido, comprometendo a atividade pulmonar e causando lesões (KAPOOR et al, 2013, GOPAL et al 2013; REECE E KAUFMANN, 2012; DORHOI et al 2011).

O *Mycobacterium bovis* (BCG), um membro da família do *Mycobacterium tuberculosis*, conforme supracitado, é o principal bacilo utilizado como modelo experimental em animais e comumente não é virulento ao homem. O BCG ainda é a única vacina disponível contra a tuberculose e esta linhagem atenuada foi isolada após 230 passagens seriadas em glicerol, de 1908 a 1921, por Albert Calmette e Camile Guérin, que dão nome ao bacilo, no Instituto Pasteur em Lille, na França (CALMETTE et al, 1924). Posteriormente foi concedido a laboratórios do mundo todo e se tornou amplamente distribuído e tomou grande importância médica quando foi apresentado pelo Programa Expandido de Imunização da Organização Mundial de Saúde em 1974 (JOUNG et al, 2013).

Durante a resposta ao BCG, a migração de leucócitos para o compartimento alveolar é bastante característica e o primeiro fagócito a se mobilizar para o sítio inflamatório são os neutrófilos (NEUFERT et al, 2001). Monócitos são encontrados nestes locais pouco depois dos neutrófilos e podem ser modificados localmente para macrófagos e células dendríticas (SKOLD E BEHAR, 2008). A ativação dos neutrófilos aumenta a resposta imune inata e leva a produção de peptídeos anti-microbianos, liberação do conteúdo de seus grânulos e aumento da duração da vida destas células (PERSON et al, 2009).

Por outro lado, dados também do grupo demonstram que o *Mycobacterium bovis* é capaz de promover a apoptose destes neutrófilos e que este processo leva a indução da formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos que fagocitam estes corpos apoptóticos, um processo que, de maneira geral, favorece a replicação e sobrevivência do patógeno (D'AVILA *et al*, 2006). Monócitos e neutrófilos apresentam uma superexpressão de receptores para padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), como os receptores do tipo Toll (TLRs) e a ligação do antígeno a estes inicia uma cascata de sinalização, geralmente ligada a MyD88, responsável pela ativação destes receptores (BRIGHTBILL *et al*, 1999 ; KAWAI *et al*, 2010). De fato, a literatura demonstra que animais knockout para o gene que expressa o receptor TLR2 são incapazes de montar uma resposta imune inata adequada contra infecções micobacterianas (REILING *et al* , 2002).

Neutrófilos são encontrados em grande quantidade nos sítios de infecção de pacientes com tuberculose e são constantemente recrutados para estes sítios em casos de doença crônica (RIBEIRO-RODRIGUES *et al*, 2002). CXCL8 é uma quimiocina de conhecida pela sua grande capacidade de quimioatração de neutrófilos e níveis aumentados desta são encontrados em plasma e em lavados broncoalveolares de pacientes com tuberculose (PENIDO *et al*, 2002 ; POKKALI *et al*, 2009). Outra importante quimiciana é a CCL2 a qual é uma relevante quimioatraente e ativadora de monócitos e células T CD4+, tendo papel importante na montagem de uma resposta imune frente a esta infecção em murinos (KIPNIS *et al*, 2003)

Outro importante leucócito, o eosinófilo, é um leucócito multifuncional que é a principal célula efetora em doenças inflamatórias do tipo 2, incluindo infecções helmínticas, asma e alergia e estes apresentam uma grande gama de funções imune reguladoras, incluindo a produção de citocinas e quimiocinas que vão levar a exacerbação da inflamação, secreção de muco, e remodelação dos pulmões. Eosinófilos podem ser também a fonte primária de IL-4 durante a fase inicial de respostas do tipo 2 e podem recrutar leucócitos para o pulmão durante o desenvolvimento da asma. O desenvolvimento destas células é governado por diversos fatores de transcrição, incluindo GATA-1 , PU.1, e

C/EBP, assim como por um arranjo de citocinas, em particular, GM-CSF, IL-3, IL-5, e IL-9 (ADAMKO *et al*, 2005)

Eosinofilia é também característica de infecções por micobactérias, e o recrutamento destes leucócitos é comumente associado ao crescimento irrestrito do bacilo em animais susceptíveis à infecção, bem como é um processo característico em indivíduos imunodeficientes com uma infecção secundária por *M. tuberculosis* (WERNECK BARROSO *et al*, 2000 ; ELLIOT *et al*, 2003), sugerindo que este leucócito está associado a um processo de susceptibilidade frente a estas infecções.

De maneira geral, uma das respostas principais do hospedeiro frente a infecção por *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, é a resposta mediada por células T, que produzem citocinas do tipo 1 (principalmente IFN- $\gamma$ ), que ativam macrófagos para conter o patógeno intracelular (COOPER , 2009). De fato, indivíduos deficientes na produção de IFN- $\gamma$  ou IL-12 demonstram um risco muito maior de desenvolver a doença que indivíduos saudáveis (KUMAR *et al*, 2013). Outras citocinas pró-inflamatórias são de grande importância, como TNF- $\alpha$ , que contribui para formação e manutenção do granuloma e melhor eliminação do patógeno. Além disso, a inibição de TNF- $\alpha$  em murinos leva a reativação da infecção e é uma prática válida para modelos experimentais de tuberculose crônica (KEANE *et al*, 2001). Em humanos, tratamentos contra doenças autoimunes, como doença de Crohn, que são realizados com supressão de TNF- $\alpha$  parecem ser um fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose (KEANE *et al*, 2001). A IL-17 por sua vez, está diretamente relacionada com o recrutamento de neutrófilos e o acúmulo de células T CD4+ produtoras de IFN- $\gamma$  nos sítios de infecção (KHADER *et al*, 2007 ; LOCKHART *et al*, 2006).

Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias também apresentam papel fundamental no desenvolvimento da tuberculose, por exemplo a IL-10, que em estágios iniciais da infecção, aparenta impedir a formação e maturação de granulomas fibróticos (CYKTOR *et al*, 2013), enquanto que em estágios tardios

favorece a reativação da infecção e o estabelecimento da tuberculose crônica (TURNER *et al*, 2002).

O balanço entre estes mediadores, ao controlar fatores que favorecem (como a formação de reservatórios para o patógeno em macrófagos espumosos) e desfavorecem (como redução da eosionofilia) o crescimento bacteriano, determinam o desenvolvimento da doença.

### **1.3 – Corpúsculos Lipídicos e Prostaglandina E<sub>2</sub>**

Como citado anteriormente, a diferenciação de macrófagos em “macrófagos espumosos” é uma observação patológica comum nos granulomas tuberculosos (HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 1997; CARDONA *et al.*, 2000). Este aspecto espumoso dos macrófagos é um reflexo do acúmulo intracelular de lipídios que são estocados em organelas hidrofóbicas chamadas de corpúsculos lipídicos.

Corpúsculos lipídicos são organelas com afinidade por tetróxido de ósmio e que apresentam uma monocamada fosfolipídica com centro rico em lipídeos neutros e diversas proteínas. Estas organelas estão presentes em grande parte dos leucócitos e outros tipos celulares, como células endoteliais, fibroblastos e mastócitos (DVORAK *at al*, 1993; BOZZA *et al*, 2007).

Os corpúsculos lipídicos recebem diversas denominações na literatura, dependendo do tipo celular, como por exemplo: gotas lipídicas (“lipid droplets”) em adipócitos, glóbulos lipídicos (“lipid globules”) em células mamárias, corpúsculos lipídicos ou partículas lipídicas (“lipid bodies ou particles”) em várias células animais e fungos, e corpos oleosos (“oil bodies”) em sementes de plantas superiores (MARTIN E PARTON, 2005; MURPHY, 2001). No passado, os corpúsculos foram erroneamente confundidos com vacúolos ou fagossomos, pois eram vistos como imagens negativas após colorações que não preservavam lipídios. Atualmente, com o uso de fixação apropriada e coloração ou contraste

específicos para lipídios celulares, como *sudan black* ou tetróxido de ósmio, os corpúsculos lipídicos são claramente visualizados tanto na microscopia de luz como na eletrônica (Figura 1). Os corpúsculos lipídicos também podem ser reconhecidos através da utilização de marcadores fluorescentes, incluindo Nile red, lipídios contendo sondas fluorescentes como ácido pirenododecanóico (P96), e 2-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4-diaza-s-indacene-3-pentanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfato, diammonium salt ( $\beta$ -Bodipy®FL C<sub>5</sub>-HPA) (Bozza *et al*, 2007). Dentre as proteínas localizadas em corpúsculos lipídicos, destaca-se proteínas estruturais (ADRP, Perilipina e TIP47), bem como, enzimas metabólicas, algumas quinases e pequenas GTPases da família Rab (D'AVILA *et al.*, 2008a; D'AVILA *et al.*, 2008b; D'AVILA *et al.*, 2006; BOZZA *et al.*, 2007). Por sua constituição lipídica e protéica, muitos estudos têm estabelecido que, os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas, que podem atuar como sítios de sinalização intracelular em leucócitos ativados, onde aumentam em número e tamanho em processos inflamatórios. Nos leucócitos, os corpúsculos lipídicos parecem participar da regulação do metabolismo lipídico e do controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios em resposta a infecções (D'AVILA *et al* 2011; BOZZA *et al.*, 2007; D'AVILA *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2002).

Estas organelas foram erroneamente caracterizadas por muitos anos como apenas uma reserva de energia, hoje sabe-se que os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas e com grande importância no controle da síntese de lipídeos e em processos inflamatórios. Várias proteínas já foram caracterizadas como conteúdo de corpúsculos lipídicos, entre elas, enzimas metabolizadoras de ácidos graxos, citocinas, proteínas da família RAB e pequenas GTPases (D'AVILA *et al*, 2008, D'AVILA *et al*, 2006; WAN *et al*, 2007; BOZZA *et al.*, 2007). Assim sendo, corpúsculos lipídicos podem controlar o metabolismo de lipídeo, o tráfico de membranas, a sinalização intracelular e a produção de mediadores inflamatórios diversos (D'AVILA *et al*, 2006).

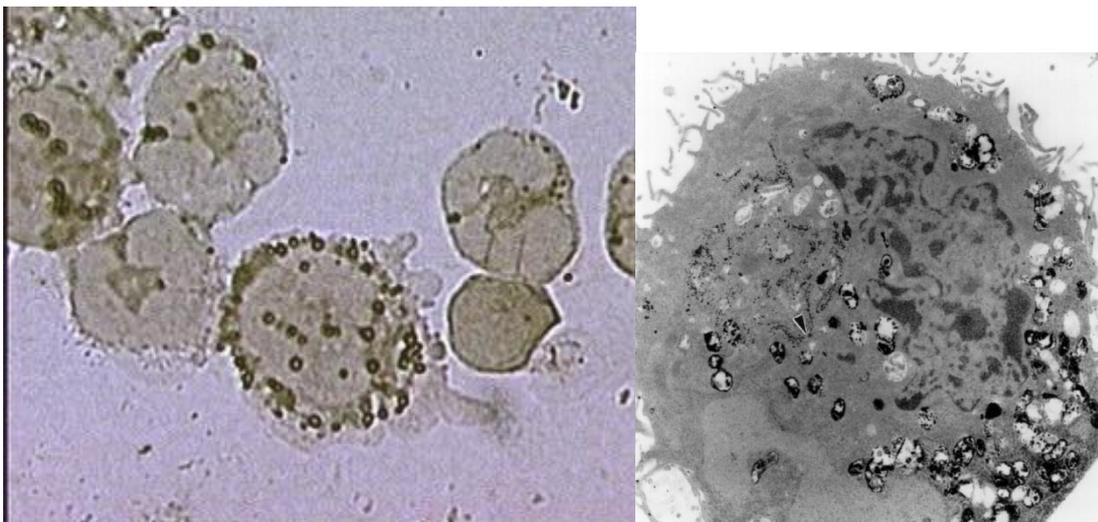


Figura 2 - Corpúsculos Lipídicos em leucócitos pleurais durante infecção por BCG, após coloração com tetróxido de ósmio (esquerda, D'AVILA *et al.*, 2006). Macrófago *espumoso* de granuloma tuberculoso (direita) (CARDONA *et al.*, 2000).

Estas estruturas são também sítio de localização de enzimas formadoras de eicoisanóides, como por exemplo, ciclooxigenase-2 e lipooxigenases. De fato, em células participantes de processos inflamatórios e neoplasias, a quantidade e o tamanho destes corpúsculos sofrem um grande aumento (D'AVILA *et al*, 2006 ; D'AVILA *et al*, 2008;). Tanto a formação destes lipídeos, quanto a compartimentalização de enzimas nos corpúsculos lipídicos são processos altamente regulados por processos inflamatórios e envolvidos no aumento da capacidade de leucócitos de formar eicosanóides frente estímulos (MELO *et al*, 2006).

Dentre estes eicosanóides, um de grande relevância é a prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), que é uma pequena molécula derivada de ácido araquidônico (AA) produzida por ciclooxigenases, como, por exemplo, a ciclooxigenase constitutivamente ativa 1 (COX1), e COX-2 (isoforma induzível) (JOHANSON *et al*, 2013). Apesar da  $PGE_2$  promover um influxo de neutrófilos, macrófagos e mastócitos para o sítio de inflamação, pela produção de quimiocinas como CXCL8 e CCL2, (NAKAYAMA *et al*, 2006) sua atuação sobre estas diversas

células apontam para um papel supressor da atividade inflamatória por parte deste eicosanóide. A PGE<sub>2</sub> reduz a capacidade citotóxica de linfócitos NK, pela redução da sensibilidade a IL-12, IL-15 e IL-2 e diminuição da produção de IFN- $\gamma$  por estes (WALKER *et al*, 2004 ; JOSHI *et al*, 2001). Limita também a capacidade de fagocitose de macrófagos alveolares bem como sua capacidade de eliminação do patógeno pela indução da cinase-M associada a IL-1R, a qual bloqueia a fagocitose mediada por receptor do tipo *scavenger* e a ativação de TNF-  $\alpha$  dependente de TLR (HUBBARD *et al*, 2010).

A PGE<sub>2</sub> também participa ativamente do balanço entre as respostas imunológicas Th1/Th2, sendo que, em baixas quantidades, demonstra a capacidade de levar esta resposta em direção a um perfil Th2/Th17 que medeia processos muito menos danosos aos tecidos (KALINSKI, 2012). Isto ocorre, pois esta atua na inibição da produção de citocinas características do perfil Th1, como IFN- $\gamma$  e não em citocinas Th2, como IL-4 e IL-5 (SNIJDEWINT *et al*, 1993). Em altas doses, PGE<sub>2</sub> atua inibindo a produção e a sensibilidade de células T a IL-2, a proliferação e ativação destas. Sendo responsável então, de maneira geral, pelo controle da proliferação e ativação de células NK, células da resposta Th1 e CTLs (KALINSKI, 2012).

#### **1.4 – Corpúsculos lipídicos e infecções micobacterinas.**

Estudos demonstram a importância dos corpúsculos lipídicos em infecções micobacterianas, como por exemplo pelo *Mycobacterium leprae* (MATTOS *et al*, 2009 ; MATTOS *et al*, 2010). Neste caso, o fenômeno de acúmulo de lipídeos observados durante a doença apresenta um papel importante na patogênese da lepra por facilitar a persistência bacteriana no hospedeiro por transformar células presentes nas lesões em sítios catalíticos ativos de produção de PGE<sub>2</sub>, inibindo então as atividades bactericidas do

macrófagos e regulando negativamente a resposta imune (MATTOS *et al*, 2010). Além disso, foi demonstrado que lipídeos representam uma fonte de nutrição importante para a micobactéria, ajudando também a persistência destes no hospedeiro (PANDEY *et al*, 2008).

Já na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, o ácido araquidônico livre e a transformação do ácido araquidônico em suas formas oxigenadas, parecem modular a sobrevivência do bacilo, uma vez que em pequenas quantidades, a PGE<sub>2</sub> regula positivamente a produção de iNOS e o amadurecimento do fagossoma, enquanto em grandes quantidades, regula negativamente, suprimindo a resposta celular e permitindo a progressão da doença (RANGEL MORENO *et al*, 2002). A supressão da produção de PGE<sub>2</sub> impede o crescimento da micobactéria (RANGEL MORENO *et al*, 2002), indicando que, a formação de corpúsculos lipídicos, bem como a consequente indução a produção aumentada de PGE<sub>2</sub>, aparentam favorecer o patógeno e a progressão da infecção. Kim e colaboradores (2010) demonstraram abundante concentração de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico no granuloma tuberculoso em pacientes humanos, sugerindo um desequilíbrio do metabolismo lipídico das células hospedeiras induzido pelo patógeno.

De fato, trabalhos anteriores demonstraram que no modelo experimental em camundongos, uma dieta rica em lipídios, bem como a estimulação com leptina (MAYA-MONTEIRO, *et al*, 2008), são capazes de causar um estímulo à produção de corpúsculos lipídicos, eicosanóides derivados destas organelas, e citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6 (LEITE, *et al.*, 2005). Além disso, a literatura demonstra que macrófagos espumosos podem ser reservatórios de longa duração para o *Mycobacterium tuberculosis* (PEYRON *et al.*, 2009).

Estes estudos tomados em conjunto sugerem que o tecido adiposo pode contribuir não somente na fisiopatologia da resposta inflamatória durante tuberculose, mas também ser sítio de acúmulo de bactérias em estado latente. Tornando promissor o estudo da obesidade no desenvolvimento da

fisiopatologia da tuberculose, para melhor compreender os mecanismos ainda obscuros do desenvolvimento da doença.

### 1.5- Obesidade e doenças infecciosas

Obesidade é um grande problema de saúde mundial, sendo associada a morte de quase 3 milhões de pessoas no mundo, sendo que hoje 12% da população mundial é considerada obesa e mais de 1,5 bilhões de pessoas estão em sobrepeso. No Brasil, dados do Ministério da Saúde apontam que mais da metade da população se encontra na situação de sobrepeso. As causas da obesidade são diversas, podendo variar entre fatores sócio econômicos, alimentação, fatores genéticos, doenças adquiridas, uso de medicamentos e falta de atividade física regular (OMS).

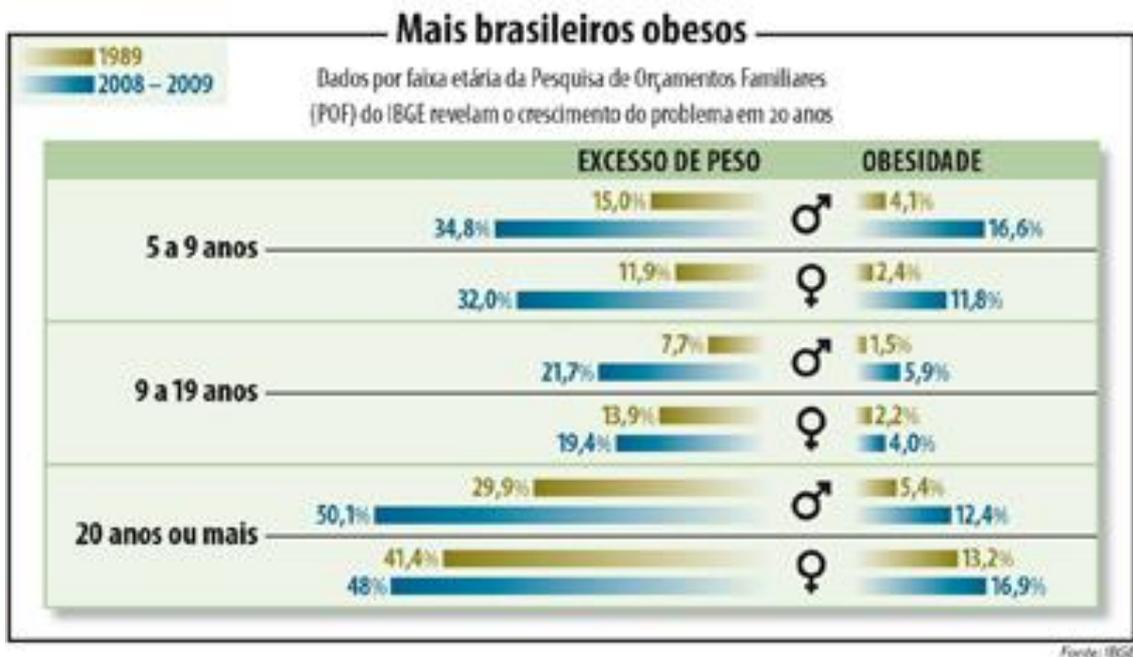


Figura 3: Evolução do número de pessoas obesas e em sobrepeso no Brasil de 1989 a 2009 (IBGE, 2009).

Obesidade, como um excesso de tecido adiposo, é atribuída a eventos sequenciais de hiperplasia e hipertrofia de adipócitos. Esse ganho exacerbado de tecido adiposo está relacionado com os problemas comumente decorrentes da obesidade, como maior risco de doenças cardíacas, infarto, tromboembolismo venoso, hiperglicemia, hiperlipidemia, hipertensão, e asma (GUILHERME *et al*, 2008). Recentemente, processos inflamatórios tem surgido como mediadores importantes destas condições (VENDRELL *et al*, 2009).

Esse ganho exacerbado de tecido adiposo se deposita principalmente de modo visceral e subcutâneo (SAMARAS *et al*, 2010), porém também não é raro acúmulos de adipócitos por todo o corpo, associado a diversos órgãos, como coração, rins, medula óssea e pulmões, associados a estados inflamatórios locais (CHATTERJEE *et al*, 2009).

A obesidade está associada a uma resposta inflamatória crônica no tecido adiposo branco decorrente de uma constante infiltração de macrófagos, sendo estes responsáveis pela superexpressão de TNF- $\alpha$ . Camundongos obesos apresentam uma maior quantidade de ácidos graxos livres, os quais ativam receptores do tipo toll 4 (TLR4) que medeiam positivamente a expressão de TNF- $\alpha$  que por sua vez induz fosforilação do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) em resíduos de serina, fato que impede a interação da proteína IRS-1 com a subunidade beta do receptor interrompendo a via de sinalização da insulina. Por outro lado receptores TLR2, que regulam negativamente a expressão deste fator, aparentam ser disfuncionais nos macrófagos de indivíduos obesos, levando a um acúmulo local desta citocina (ZHOU *et al*, 2011). Boa parte da produção de IL-6 presente nestes sítios, também é produzida por estas células infiltradas. Além destes marcadores pró-inflamatórios, a obesidade está relacionada com a desregulação na produção de leptina (KARLSSON E BECK, 2010).

Leptina é um hormônio responsável pela regulação do apetite e a resistência a este é um fator importante no desenvolvimento da obesidade (OZATA *et al*, 1999). Além disto, a leptina tem importante papel na quimiotaxia de neutrófilos, geração de espécies reativas de oxigênio, geração e

citotoxicidade de células natural-killer (GENONI *et al*, 2014) e regulação de diversas citocinas e perfis imunológicos, como o aumento na produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto promove redução na produção de IL-4, tendo assim um importante papel na regulação do balanço entre a resposta Th1/Th2. A leptina também modula a produção de citocinas por macrófagos/monócitos, como por exemplo, aumenta a produção dependente de LPS de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 em macrófagos peritoneais de camundongos e em monócitos humanos (LOFFREDA *et al*, 1998 ; SANTOS-ALVAREZ *et al*, 1999). Ela também tem um papel chave na linfopoiese e na mielopoiese, representando uma fonte importante de estímulos pró-sobrevivência de timócitos durante a maturação de células T (GENONI *et al*, 2014). Humanos com deficiência na produção deste hormônio apresentam susceptibilidade a doenças infecciosas oportunistas, com menor proliferação de linfócitos T CD4+, menor produção de interferon- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 e aumento na produção de TGF- $\beta$  (LAM e LU, 2007) e criança deficientes de leptina apresentam peso normal ao nascimento, mas rapidamente evoluem para um quadro de hiperfagia e obesidade infantil e, como já demonstrado, sofrem com infecções recorrentes desde os estágios iniciais de vida (GENONI *et al*, 2014).

A obesidade desregula também a produção de adiponectina, um hormônio proteico, sendo que em homens obesos, os níveis séricos desta proteína específica do tecido adiposo é consideravelmente menor que em homens magros (YANG *et al*, 2001). A adiponectina é ligada a sensibilização da insulina. Esta é produzida pelos adipócitos e apresenta uma grande gama de células alvo, como hepatócitos, cardiomiócitos e células beta do pâncreas (HOLLAND *et al*, 2011). A adiponectina esta ligada a patologias com componente inflamatório, como doenças cardiovasculares, disfunções endoteliais, diabetes tipo 2, doenças reumáticas e possivelmente, doenças infecciosas diversas (MATSUZAWA *et al*, 2006). O papel da adiponectina ainda não é totalmente compreendido, mas sabe-se que em alguns casos ela pode induzir a produção de citocinas como IL-6, IL-8 e também a produção de PGE<sub>2</sub> (LEE *et al*, 2012), porém, de maneira geral, adiponectina participa da expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-1RA (WULSTER-

RADCLIFF *et al*, 2004) e atua na supressão da via do NF-kB dependente de TNF- $\alpha$ , interrompendo a sinalização dependente de cAMP, inibindo assim a transcrição de genes pró-inflamatórios, apresentando um papel anti-inflamatório e anti-apoptótico, se tornando um alvo interessante em patologias causadas por resposta inflamatória exacerbada (RAKATAZI *et al*, 2004).

A literatura mostra também, que a obesidade está relacionada com a alteração da população de linfócitos T circulantes, inibindo a quantidade de linfócitos CD8+ e NK e a liberação de células T-naive pelo timo, tendo consequências importantes na resposta a certos tipos de patógenos. Foi demonstrado que indivíduos obesos apresentam uma menor resposta primária ao vírus influenza, pela diminuição da produção de IFN - $\alpha$ / $\beta$ , além de maior susceptibilidade a infecções por *Mycobacterium abscessus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneueumoniae* (KARLSSON E BECK, 2010).

## 1.6 – Obesidade e a tuberculose

A influência da tuberculose e a obesidade ainda é pouco compreendida e pouco estudada e , apesar de estudos demonstrarem que de maneira geral a obesidade é prejudicial à montagem de respostas imunológicas eficientes contra diversos patógenos, alguns estudos recentes começam a demonstrar que de alguma maneira, a obesidade resulta em risco menor de desenvolvimento de tuberculose pulmonar, bem como em respostas mais brandas e menos lesivas por parte do sistema imunológico do hospedeiro (HANRAHAN, 2010 ; LEUNG *et al*, 2010). Além disso, a literatura a muito tempo demonstra que estar abaixo do peso (ou seja, baixo IMC) é um fator de risco para desenvolvimento da doença (TVERDAL, 1986 ; PALMER *et al*, 1957)

Uma pesquisa realizada em Hong Kong, com 2 mil pacientes idosos demonstrou que, indivíduos obesos apresentaram uma incidência 36% menor

de tuberculose ativa do que indivíduos com baixo peso corporal (LEUNG *et al*, 2010) e outro estudo demonstra que a taxa de mortalidade em pacientes soropositivos devido a uma infecção secundária oportunista por *Mycobacterium tuberculosis* cai drasticamente em indivíduos obesos em relação aos magros, indicando que a obesidade pode representar um favor de algum modo protetor, frente a esta infecção (HANRAHAN, 2010).

Tendo em vista a literatura conflitante sobre o efetivo papel da obesidade em infecções bacterianas e os possíveis mecanismos que modulam a resposta do hospedeiro no curso destas infecções, tornam os estudos sobre a relação da obesidade com a tuberculose uma área bastante promissora.

## 2 – Objetivos:

### 2.1 – Objetivo geral:

- Avaliar o envolvimento da obesidade na fisiopatologia da tuberculose, utilizando um modelo experimental de infecção por *M. bovis* BCG em camundongos, com a finalidade de elucidar potenciais alvos para o desenvolvimento de novas estratégias no combate a tuberculose.

### 2.2 – Objetivos específicos:

- Investigar o envolvimento da obesidade na migração de células durante infecção experimental por *M. bovis* BCG em camundongos susceptíveis;
- Comparar a formação de corpúsculos lipídicos nos leucócitos do sítio inflamatório nos animais infectados obesos e magros;
- Analisar a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> nos animais infectados obesos e magros
- Comparar a produção das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias nos animais infectados obesos e magros;
- Investigar a produção das adipocinas, leptina e adiponectina, nos animais infectados obesos e magros;

## 3. Metodologia

### 3.1 – Animais.

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6, com idade de 5 a 6 semanas de vida e peso médio variando entre 20 a 25 gramas, obtidos do Centro da Biologia da Reprodução (CBR – UFJF).

Estes animais foram acondicionados em gaiolas de propileno, cobertas com cama de maravalha, dotadas de cocho para ração e local para mamadeira com água filtrada. Os animais foram divididos em 5 animais para cada gaiola de 30 x 19 x 13 cm ou 10 animais para cada gaiola de 49 x 34 x 16 cm e foram mantidos no Laboratório de Biologia Celular e no Laboratório de Imunologia durante o experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA-UFJF (protocolos 50/2012 e 109/2012).

### 3.2 – Dieta e indução do modelo de obesidade

Os animais foram aclimatados por cerca de 10 dias no laboratório de Biologia Celular e, em seguida, foram pesados para termos o peso destes animais no momento de início do tratamento (dieta) e receberam marcações na cauda para identificação de cada indivíduo. Feito isto, os animais receberam por 0 (T0), 60 ou 90 dias dieta especial hiperglicídica, enquanto os animais controles (magros) receberam apenas a ração comum Nuvital®.

A ração hiperglicídica foi produzida em nosso laboratório, aonde cada ingrediente foi precisamente pesado utilizando uma balança BK300 da Indústria e Companhia Eletro-Eletrônica Gehaka® e homogenizado manualmente. A

mistura foi transferida para uma forma convencional e colocada em uma Estufa de Secagem e Esterilização da empresa Labor® a temperatura de 60°C por cerca de 3 horas para dar a ração aspectos físicos mais próximos da ração comum controle Nuvital®. A composição da ração hiperglicídica está descrita na tabela 01.

Duas vezes por semana foi realizado o monitoramento do consumo de ração por cada grupo. Ao final de cada semana, estes animais foram pesados para realizar o controle do ganho de peso em relação ao tipo de dieta apresentada.

Ingrediente	Peso (g)
Ração comum Nuvital	660
Leite condensado	660
Água	540
Açúcar Refinado	140

**Tabela 1:** Composição da dieta hiperglicídica descrita.

### 3.3 – Delineamento Experimental

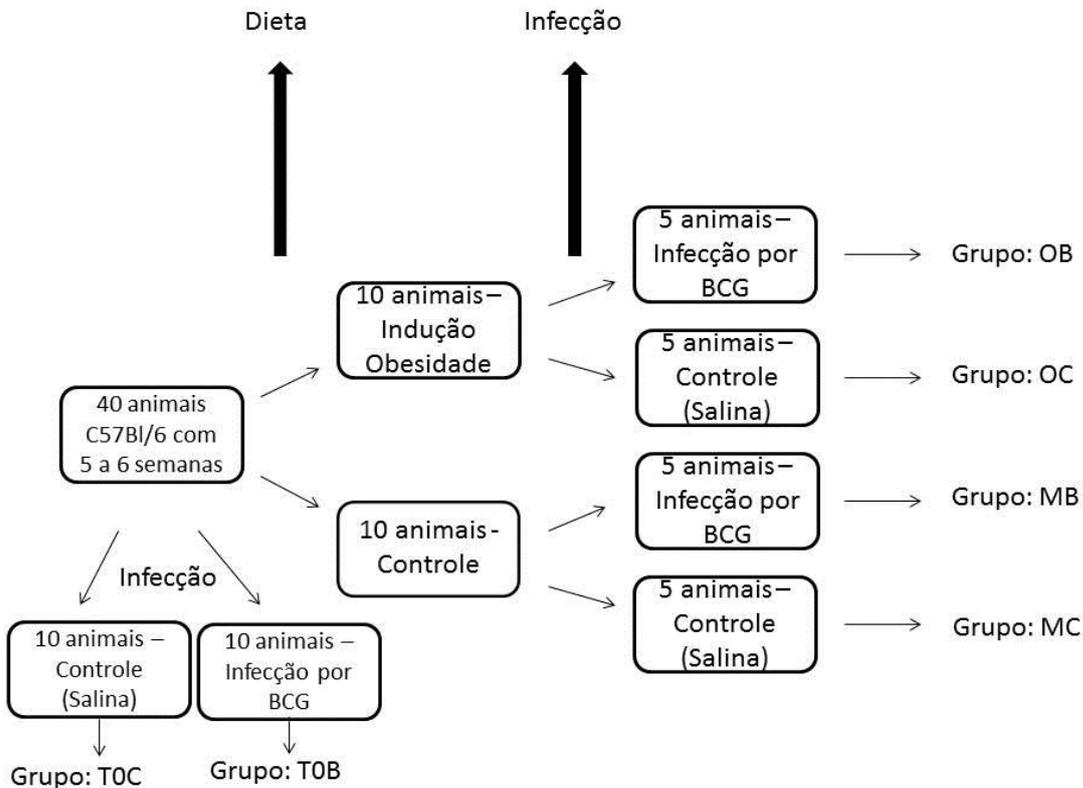


Figura 4: Representação esquemática do delineamento experimental.

Para avaliarmos a influência da obesidade na infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos, utilizamos o modelo de obesidade induzida por tratamento com dieta hiperglicídica (PARK et al., 1999) por dois ou três meses, seguido da infecção intrapleural com BCG, conforme demonstrado na figura 4.

Os animais infectados e controles tiveram a glicemia pré e pós pandrial medida 24 horas após a infecção, e foram eutanasiados por overdose de tiopental para a coleta de sangue, lavado pleural e gorduras retroperitoneal e perigonadal.

Os dados da glicemia e a coleta de gordura foram utilizados como parâmetros do modelo de obesidade em estudo, para demonstrar uma possível resistência à insulina e adiposidade induzida pela dieta. No lavado pleural foi avaliado o influxo de leucócitos para o sítio da infecção, tanto quantitativamente, quanto qualitativamente, bem como a formação de corpúsculos lipídicos nestas células, ambos os casos, por microscopia de luz. Este material foi usado também para a dosagem das citocinas, adipocinas e PGE<sub>2</sub>. O sangue coletado foi centrifugado e o plasma sobrenadante foi armazenado para futura dosagem de leptina.

### **3. 4- Infecção**

Foi utilizada a vacina *Mycobacterium bovis* BCG (cepa Moreau) obtida da Fundação Athaulfo de Paiva, RJ, tendo cada embalagem uma ampola com 40 mg do bacilo. O BCG foi diluído em salina estéril a uma concentração de 10 mg/ml e armazenado em geladeira. Metade dos animais dos grupos T0, da dieta controle (magros) e dieta especial (obesos) foram infectados com 100 µl da solução supracitada de BCG através de injeção intratorácica (i.t.), realizada com uma seringa de um 1 ml e uma agulha de 0,45 x 13 mm, e estimulados por 24h. A outra metade dos animais (controles) receberam 100 µl de solução salina estéril.

### **3.5- Curva glicêmica**

Após 0, 60 ou 90 dias de tratamento com dieta controle ou especial, os animais infectados 24h por BCG e controles, submetidos ao jejum de 12 horas, tiveram sua glicemia pré prandial medida, com auxílio de um aparelho tradicional de medição de glicemia (Accu chek perfoma). Em seguida, os animais recebem uma injeção peritoneal de solução de glicose de 2 g/kg.

Após uma hora, foi realizada a medição pós prandial para realização da curva glicêmica.

### **3.6- Eutanásia e lavado pleural**

Os animais foram anestesiados com tiopental (150 mg/kg, i.p.) em seguida foi realizado o lavado pleural com injeção de 1 ml de PBS levemente resfriado na cavidade torácica, o qual foi coletado, após agitação da cavidade, e armazenado em tubos tipo eppendorfs a -80° C.

Em seguida, foi realizada a punção cardíaca com o uso de seringas pré-heparinizadas de 3 ml, com agulhas de 0,45 x 13mm no animal com o tórax já aberto e o coração exposto. Consequente a este processo, os animais foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia.

### **3.7- Extração do tecido adiposo.**

Tecidos adiposos das regiões perigonadais e retroperitoniais foram removidos de cada animal e realizada a pesagem desse material para verificar a relação entre sua quantidade e a dieta a cada grupo apresentada.

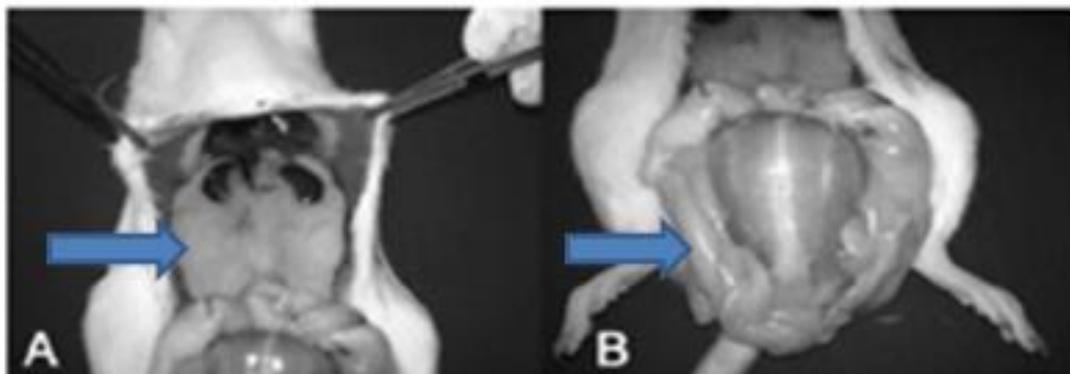


Figura 5: Demonstração da localização das gorduras retroperitoneal (A) e peritonadal (B) (Malafaia *et al*, 2013).

### 3.8- Contagem de influxo de leucócito para cavidade pleural

Para contagem total de leucócitos, 10  $\mu$ l do lavado pleural foram diluídos em 390 ml de solução de turk (cristal violeta a 0,005% em solução de ácido acético a 2% em PBS) para hemólise dos eritrócitos e coloração do núcleo dos leucócitos. Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer sob microscopia de luz. Citoesfregaços contendo cerca de 1 a 3  $\times 10^5$  células/lâmina foram preparados (450 rpm/5 min). As lâminas destinadas a contagem diferencial de leucócitos, foram coradas com um kit de panótico rápido (Laborclin) para a contagem diferencial de leucócitos, sendo que cada lâmina ficou emersa em cada corante por 2 minutos. Foram contadas 100 células consecutivas em microscópio de luz, com objetiva de 100x, para o estabelecimento das porcentagens de cada tipo celular. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM.

### **3.9 - Contagem de Corpúsculos Lipídicos.**

As lâminas destinadas a coloração por tetróxido de ósmio foram fixadas em formaldeído a 3,7% por pelo menos 10 minutos, lavadas em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4) e coradas em tetróxido de ósmio a 1,5% por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada, tratadas com tetróxido de ósmio a 1,5% reduzido por tiocarbohidrazida a 1% por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, lavadas em tampão de cacodilato 0,1M e coradas com tetróxido de ósmio a 1,5% por 3 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e montadas. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, com objetiva de 100x. Foram contados os corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

### **3.10 – Processamento do lavado pleural**

Após a preparação dos citoesfregaços, o lavado pleural foi centrifugado 10.000 rpm/1 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado (-80°C) para dosagem de citocinas, leptina, adiponectina e prostaglandina E<sub>2</sub>.

### **3.11 - Dosagem das citocinas e adipocinas**

A concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10 e as adipocinas leptina e adiponectina no lavado pleural foi determinada por ELISA por meio da utilização de kits Duo set (R&D Systems) e os ensaios foram realizados seguindo as recomendações do fabricante. A leitura da densidade ótica foi

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

### **3.12 – Dosagem de PGE<sub>2</sub>**

A concentração de PGE<sub>2</sub> no lavado pleural foi determinada pelo Ensaio Imunoenzimático - EIA seguindo as recomendações do fabricante (Cayman Chemical). A leitura da densidade ótica foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 405 nm utilizando o programa Softmax Pro. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

### **3.13 – Processamento das imagens**

As imagens foram capturadas a partir das laminas confeccionadas para a análise quantitativa e qualitativa do recrutamento celular para o sítio de infecção, bem como as lâminas confeccionadas para a contagem da indução da formação de corpúsculos lipídicos pelo *Mycobacterium bovis* BCG. O equipamento utilizado foi o PanoramicScan da 3D HDHITECH e as imagens foram processadas pelo seu programa próprio PanoramicViewer para posicionamento da barra de escala e ajuste do foco e aumento (80x).

### 3.14 – Gráficos e Análise Estatística

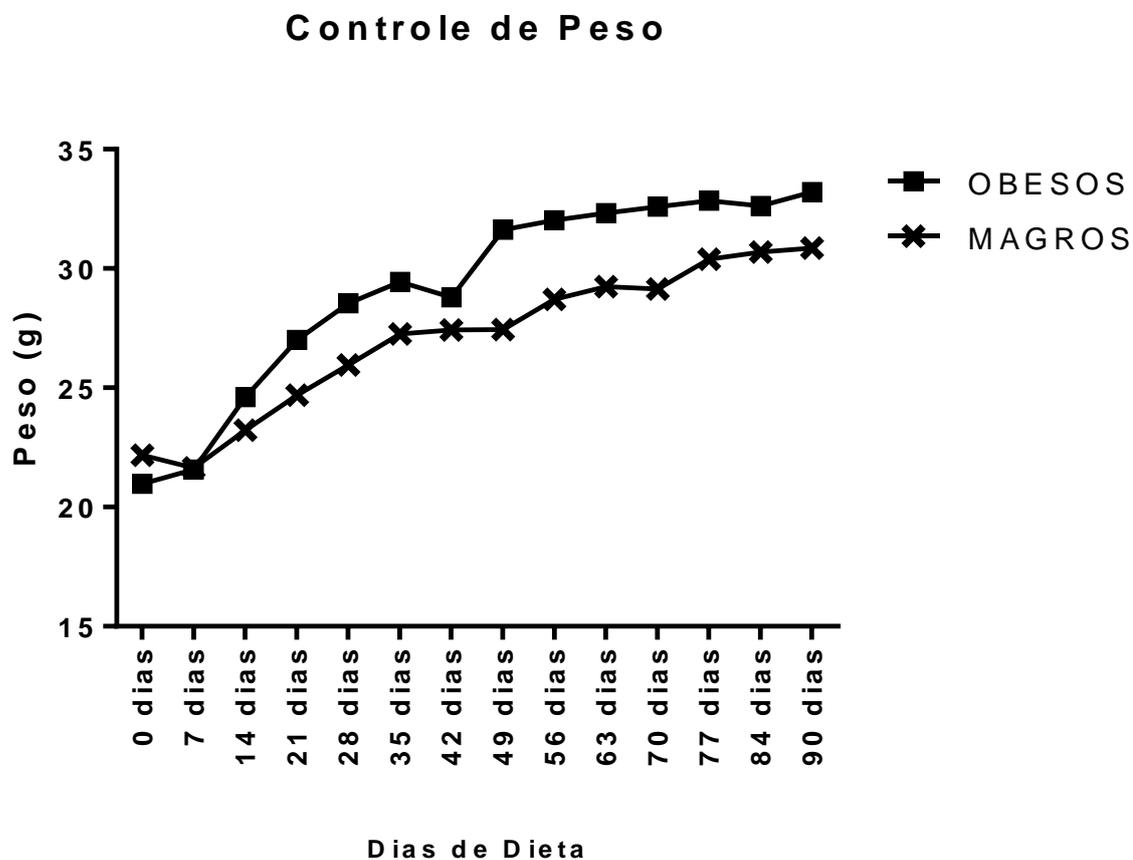
Os gráficos foram montados através do programa GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software) e os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM e analisados estatisticamente segundo ANOVA seguido pelo teste  $t$  de Student, com significância de  $p < 0.05$ .

## 4 – Resultados

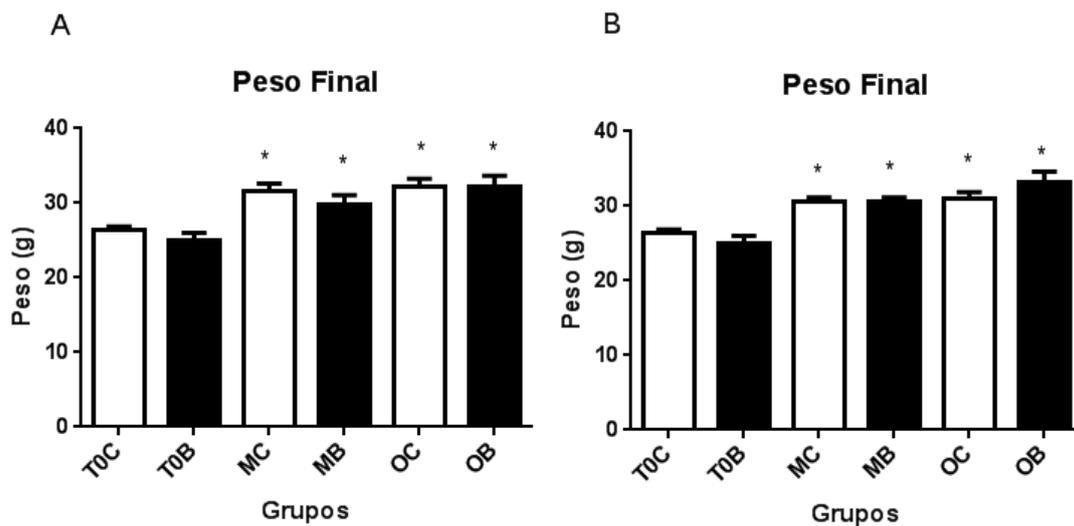
### 4.1- Efeito da Dieta hiperglicídica no ganho de peso em camundongos C57/Bl6.

Alguns trabalhos demonstraram que a obesidade influencia na resposta inflamatória a certos tipos de patógenos por induzir um estado de inflamação crônica decorrente da infiltração de macrófagos no tecido adiposo e a indução da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 por estes macrófagos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; GOLDBERG, 2009). A obesidade afeta também produção de linfócitos T pelo timo, as quantidades de células NK e T CD8+ circulantes e menor produção de IFN - $\alpha$ / $\beta$ , afetando então, de maneira geral, a resposta imunológica (KARLSSON E BECK, 2010). Com base nisso, animais foram tratados por 0, dois e três meses com dieta hiperglicídica com intuito de induzi-los a um estado de obesidade.

Nossos dados demonstram que os animais que receberam a dieta especial, apresentam já a partir da segunda semana de tratamento um peso médio maior (Figura 6) que os animais que receberam a dieta controle, porém o peso final entre os grupos tratados, após 3 e 2 meses de tratamento, difere significativamente apenas em relação aos animais em tempo zero, indicando que enquanto existe um ganho de tecido adiposo por parte dos animais obesos, existe um ganho compensatório de massa magra por parte dos animais magros (Figura 7).



**Fig 6 – Controle do ganho de peso dos animais ao longo do período experimental.** Camundongos (n≥3) foram pesados semanalmente, a partir do início do tratamento, para o controle do ganho de peso até o final dos três meses de dieta controlada. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5®. Os resultados foram expressos como média ± EPM.

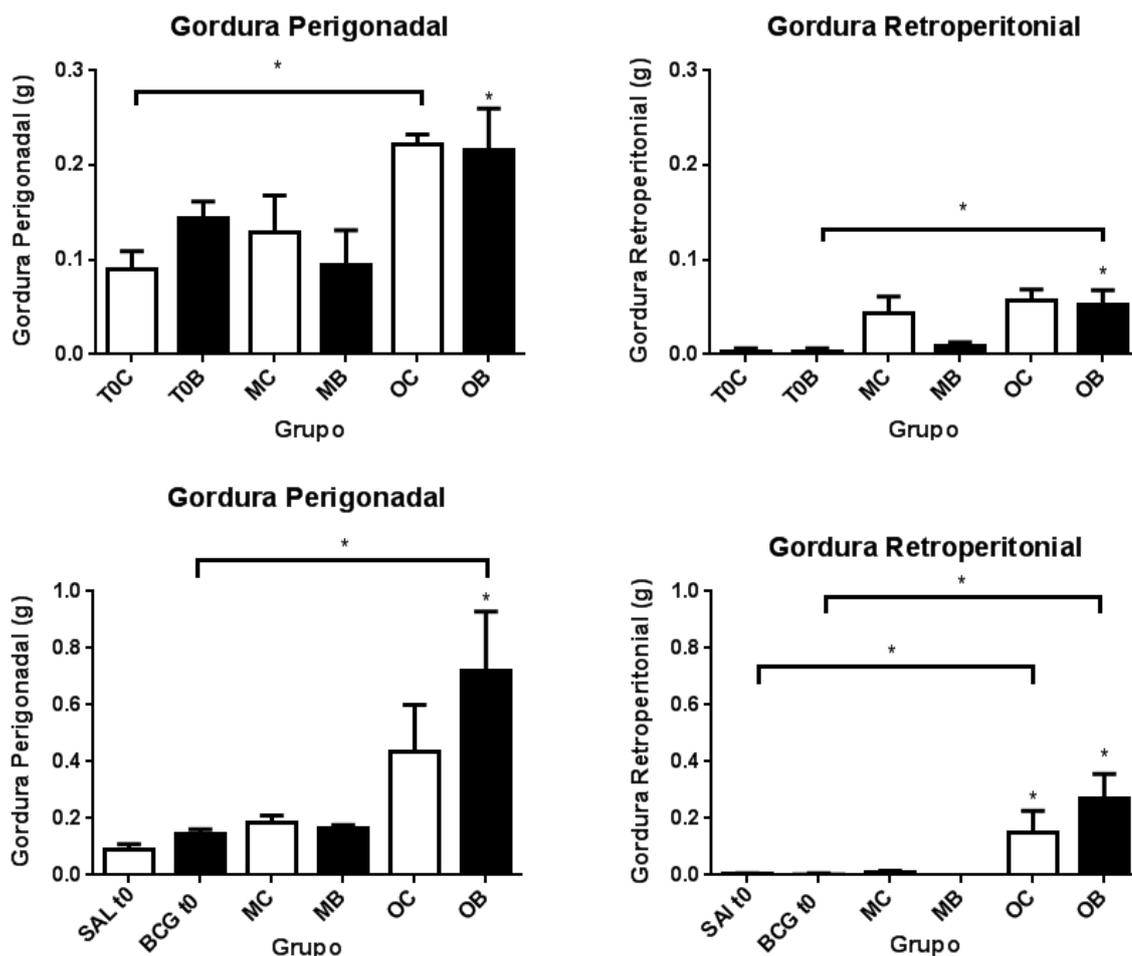


**Fig 7 – Peso final dos animais em tempo zero, em dieta controle e em dieta hiperglicídica.** Camundongos ( $n \geq 3$ ) foram pesados no dia da eutanásia para controle do ganho de peso com tratamento de T0, três meses (A) e dois meses (B). O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  dos grupos T0 em relação aos outros grupos. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM.

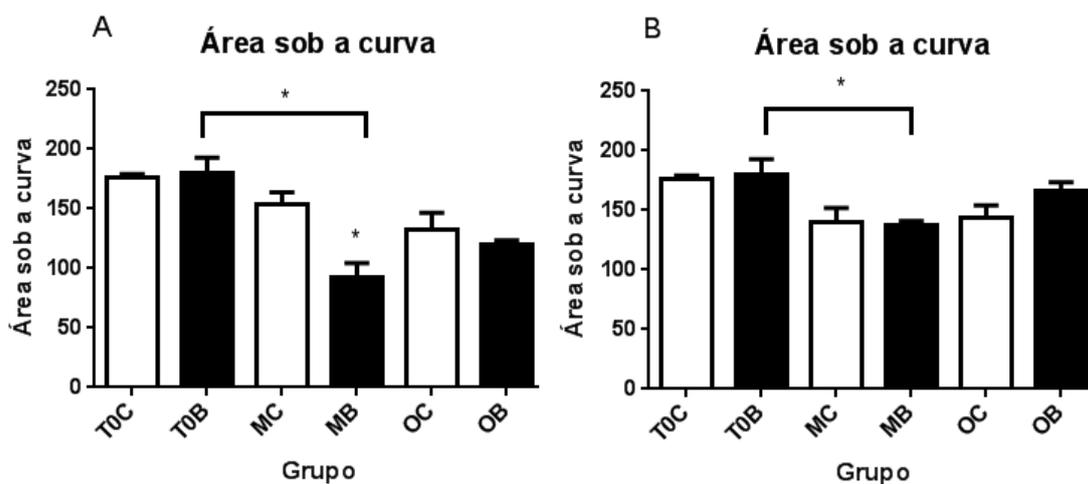
#### **4.2- Dieta hiperglicídica induziu ganho de gordura retroperitoneal e perigonadal.**

Vários fatores são importantes para a caracterização de um quadro de obesidade, como IMC, adipocidade, diminuição da tolerância á glicose, medidas corporais como circunferência abdominal, entre outros (OMS, 2012). Para experimentação animal, os fatores mais avaliáveis são a adiposidade e a resistência à glicose e por isso, nós medimos estes parâmetros a partir das gorduras retroperitoneais e perigonadais destes animais, além da realização da curva glicêmica dos animais em jejum de 12 horas.

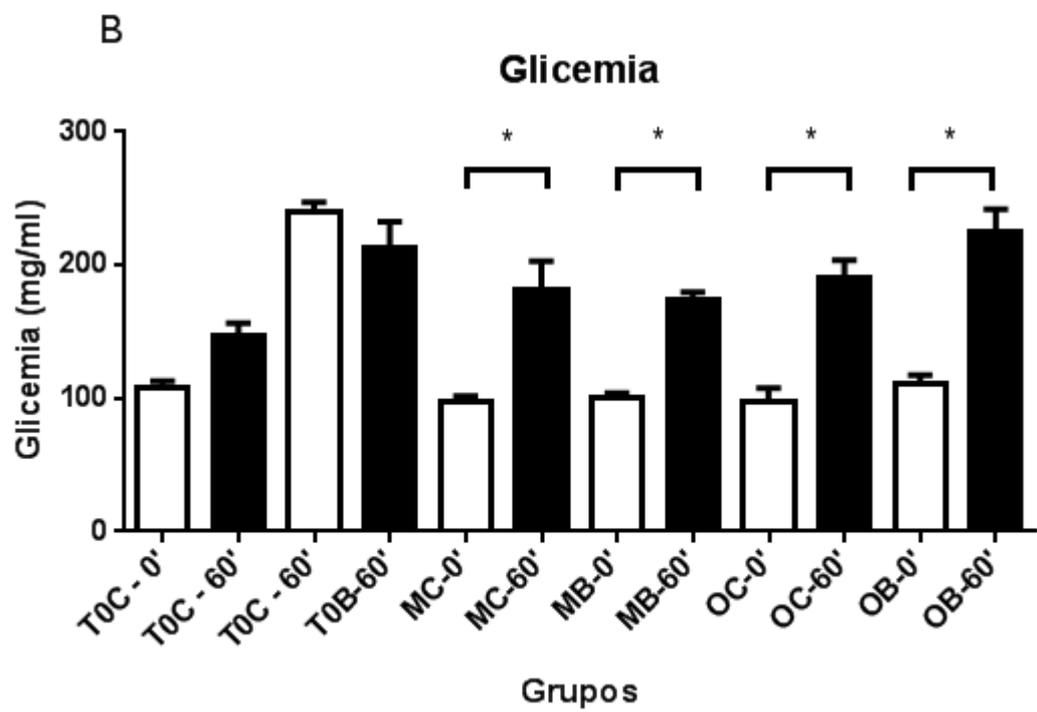
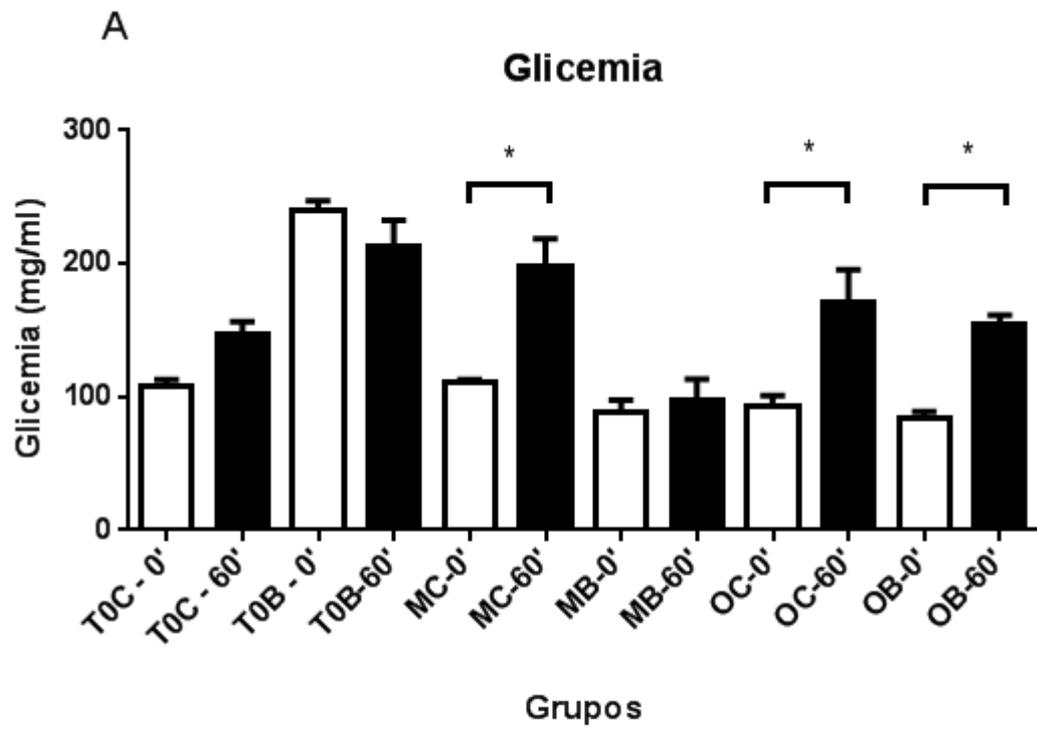
Nosso resultados demonstraram que, após o tratamento com dieta hiperglicídica, os animais apresentaram um ganho significativo de gordura retroperitoneal e perigonadal em relação aos animais que receberam a dieta controle e os animais T0 (Fig. 8 A - D). Porém, não foi caracterizado um quadro de diabetes pelos animais tratado, apesar dos nossos dados apontarem para uma diminuição da tolerância à glicose frente ao tratamento (Fig 9 e 10), indicado pela diminuição da área sob a curva.



**Fig 8 – Acúmulo de gordura nas regiões perigonadal e retroperitoneal de animais em tempo zero, dieta controle e dieta especial.** Camundongos ( $n \geq 3$ ) em tempo zero (t0), dieta controle e dieta especial de dois (C e D) e três meses (A e B) tiveram o tecido adiposo retirado das regiões perigonadal (A e C) e retroperitoneal (B e D) e pesados para quantificação. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  entre o grupo e seu respectivo controle.



**Fig 9 - Área sob a curva da curva glicêmica realizada em jejum de 12 horas dos animais em tempo zero, em dieta controle e dieta hiperglicídica.** A medição da curva glicêmica foi realizada pela medição da glicemia em animais ( $n \geq 3$ ) de 3 meses (A) e 2 meses (B) em 12 horas de jejum, seguida de injeção intraperitoneal de glicose e nova medição de glicemia 1 hora após. O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos seus respectivos controles. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM.



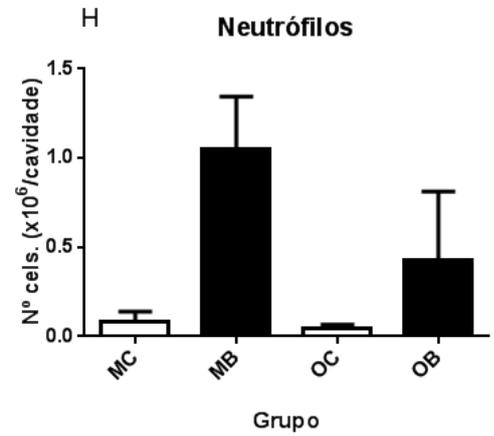
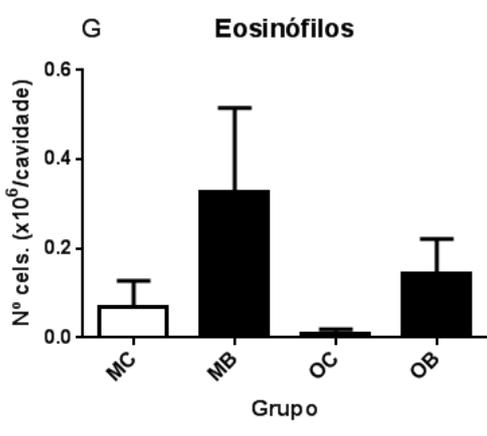
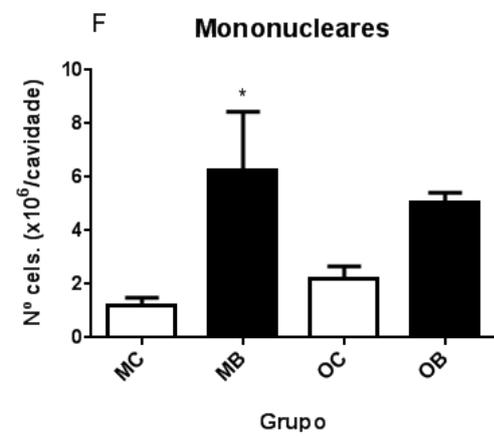
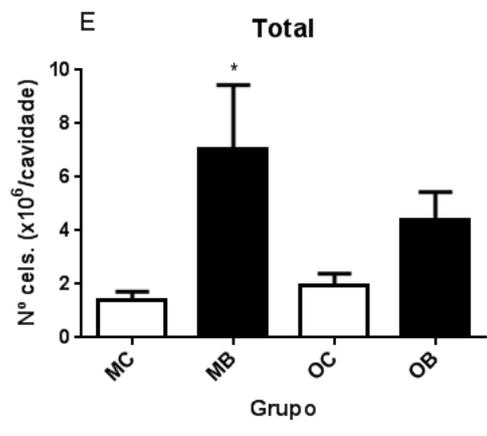
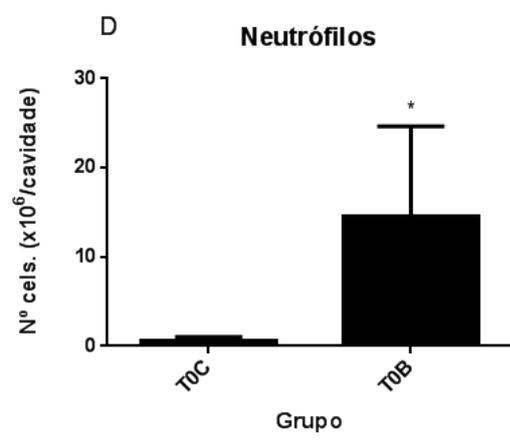
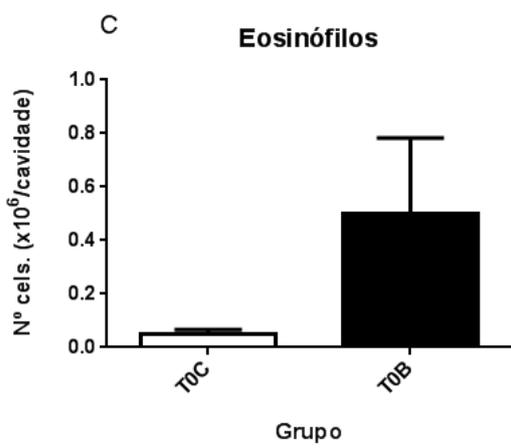
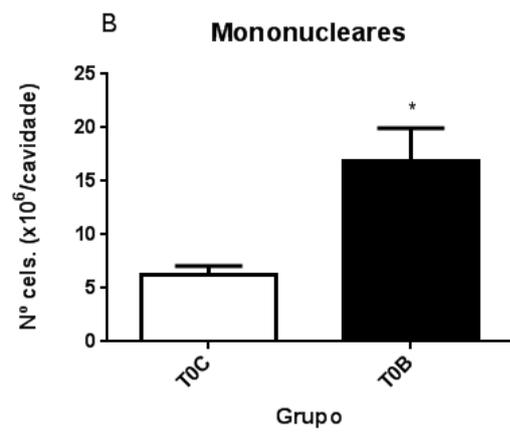
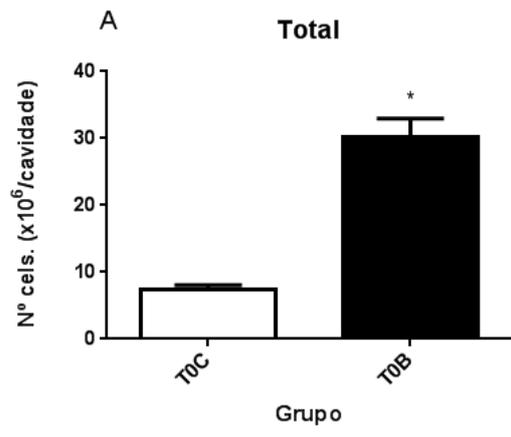
**Fig 10 – Diminuição da tolerância à glicose com aumento de glicemia em animais em dieta controlada.** A glicemia dos animais de 3 meses (A) e 2 meses (B) ( $n \geq 3$ ) foi quantificada em jejum (0') e após 60 minutos (60') da inoculação intraperitoneal de glicose. O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos seus respectivos controles. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM.

### **4.3 – A migração de leucócitos para o sítio inflamatório, frente a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG, é reduzida em animais obesos.**

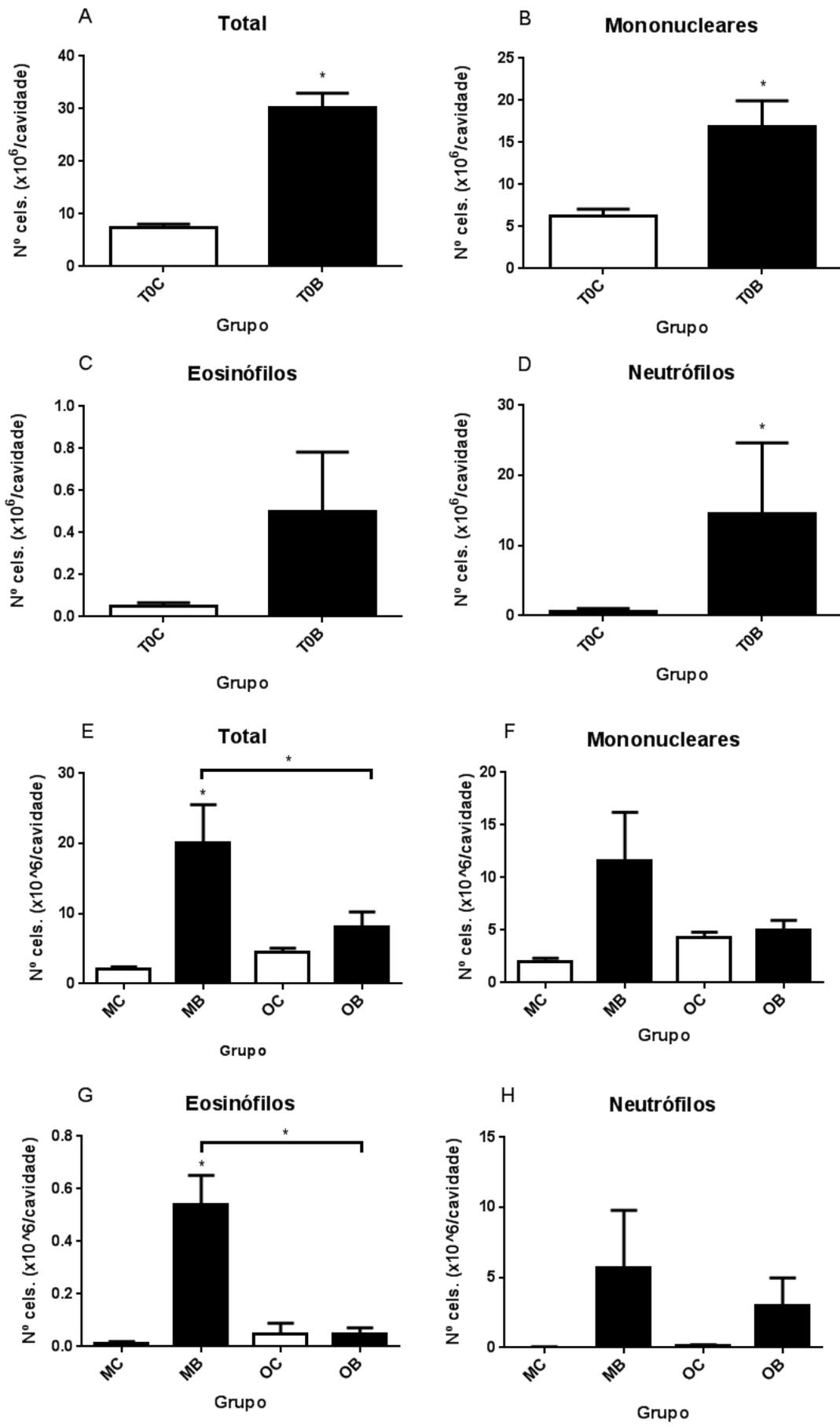
A literatura descreve uma interação da condição de obesidade com o desenvolvimento da resposta imunológica a diversos patógenos, como por exemplo, um déficit em relação a resposta primária ao vírus Influenza e maior susceptibilidade a diversas infecções bacterianas (KARLSSON E BECK, 2010). Com a finalidade de investigar a interação entre a obesidade e a tuberculose, animais obesos e magros, foram inoculados com *Mycobacterium bovis* BCG i.t. por 24 horas e tiveram lavado pleural coletado para avaliação de fatores participantes da resposta inflamatória, como por exemplo PGE<sub>2</sub> e citocinas.

Nossos resultados demonstraram que a infecção por BCG induziu uma migração de células para a cavidade pleural nos 3 grupos analisados. No entanto, animais obesos infectados apresentaram, de forma geral, um menor recrutamento de leucócitos para cavidade intrapleural em comparação com os animais T0 e magros; e este consiste em sua maioria de células mononucleadas (Fig 11 e 12, A e B), um resultado que sugere uma menor intensidade de resposta inflamatória no grupo obeso. Houve também uma significativa redução no número de neutrófilos em comparação aos animais em T0 e magros. Com relação ao número de eosinófilos, os animais obesos demonstraram uma tendência de inibição em relação aos animais T0 e magros, Estes resultados foram observados tanto nos experimentos de 2 meses, quanto

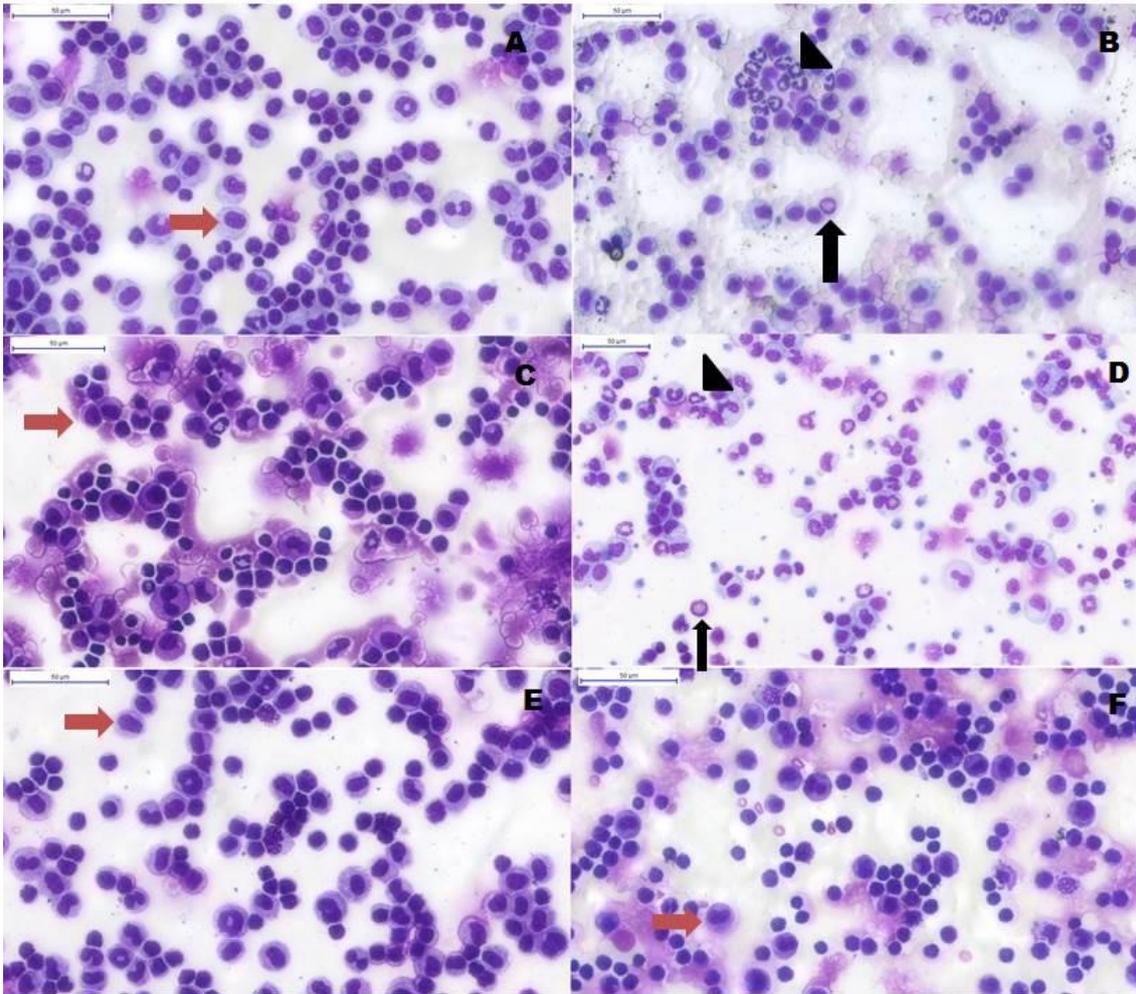
de 3 meses de dieta (Fig. 11 e 12). Imagens de microscopia de luz, capturadas pelo Panoramic Scan da 3Dhistotech demonstram qualitativamente a maior neutrofilia e eosinofilia dos animais T0B e MB frente aos animais controle e os OB (Fig 13).



**Fig 11 – Migração de leucócitos para a cavidade pleural de animais To, magros e obesos após 24h de infecção por BCG.** Animais ( $n \geq 3$ ) em tempo zero (A,B,C,D) e em três meses (E,F,G,H) de dieta hiperglicídicas foram inoculados com 100 ml de solução de BCG 10mg/ml e os controles receberam 100 ml de solução salina. Foi realizada a contagem total de células recrutadas (A,E) e a contagem relativa dentre este total de leucócitos mononucleares (B,F), eosinófilos (C,G) e neutrófilos (D,H). O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos seus respectivos controles.. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5®. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM.



**Fig 12 – Migração de leucócitos para a cavidade pleural de animais To, magros e obesos após 24h de infecção por BCG** - Animais (n ≥ 3) tempo zero (A,B,C,D) e em dois meses (E,F,G,H) de dieta hiperglicídicas foram inoculados com 100 ml de solução de BCG 10mg/ml e os controles receberam 100 ml de solução salina. Foi realizada a contagem total de células recrutadas (A,E) e a contagem relativa dentre este total de leucócitos mononucleares (B,F), eosinófilos (C,G) e neutrófilos (D,H). O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos seus respectivos controles. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5®. Os resultados foram expressos em Média ± EPM.



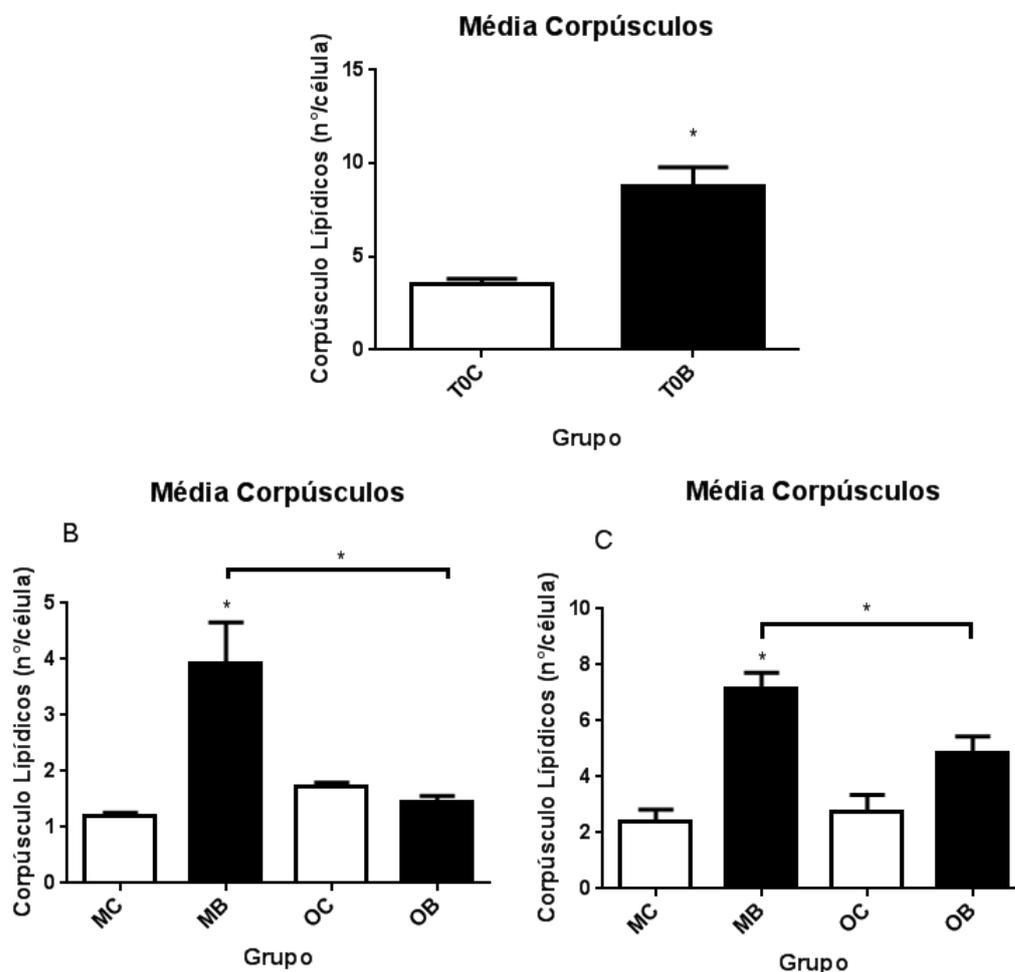
**Fig 13 – Recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção no animais controles e infectados.** Animais em tempo zero (A) , Magros (B) e Obesos (E) receberam a inoculação de 100 ml de solução de BCG 10mg/ml, enquanto animais controle em tempo zero (C), Magros (D) e Obesos (F) receberam inoculação de 100 ml de solução salina. Após 24 horas, foi coletado o lavado e feita a contagem diferencial do recrutamento celular para o sítio de infecção nestes animais, por microscopia de luz após coloração com Panótico. Imagens foram capturadas através do Pannoramic Scan da 3Dhistetch e estão apresentadas em aumento de 80x. Barra = 50 µm. As setas vermelhas indicam leucócitos mononucleares, as setas pretas indicam eosinófilos e as cabeças de setas pretas indicam neutrófilos.

#### **4.4 – A formação de corpúsculos lipídicos frente a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG é reduzida em animais obesos.**

Corpúsculos lipídicos apresentam papel fundamental no curso da infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG e a literatura demonstra que o aumento na quantidade destas organelas aparenta favorecer o patógeno, devido a uma indução na produção de Prostaglandina E<sub>2</sub> que em pequenas quantidades favorece o amadurecimento do fagossoma, porém em grandes quantidades regula a resposta negativamente suprimindo a resposta celular, favorecendo o desenvolvimento da doença (RANGEL MORENO *et al*, 2002, DÁVILA *et al*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2009). Além disso, a literatura demonstra que macrófagos espumosos podem ser reservatórios de longa duração para o *Mycobacterium tuberculosis* (PEYRON *et al.*, 2009).

Para avaliar a formação de corpúsculos lipídicos em animais magros, obesos e em tempo zero, lavado pleural foi coletado e corado com ósmio para quantificação destas organelas por célula.

Nossos dados mostram que a infecção por BCG induziu significativa formação de corpúsculos lipídicos nas células do lavado pleural, nos 3 grupos experimentais; no entanto, os animais obesos apresentaram menor número de corpúsculos lipídicos por célula que os animais magros e em T0 após 2 e 3 meses de dieta. Além disso, os animais magros também apresentaram significativa inibição na formação de corpúsculos lipídicos em comparação com os animais em T0 (Fig. 14)



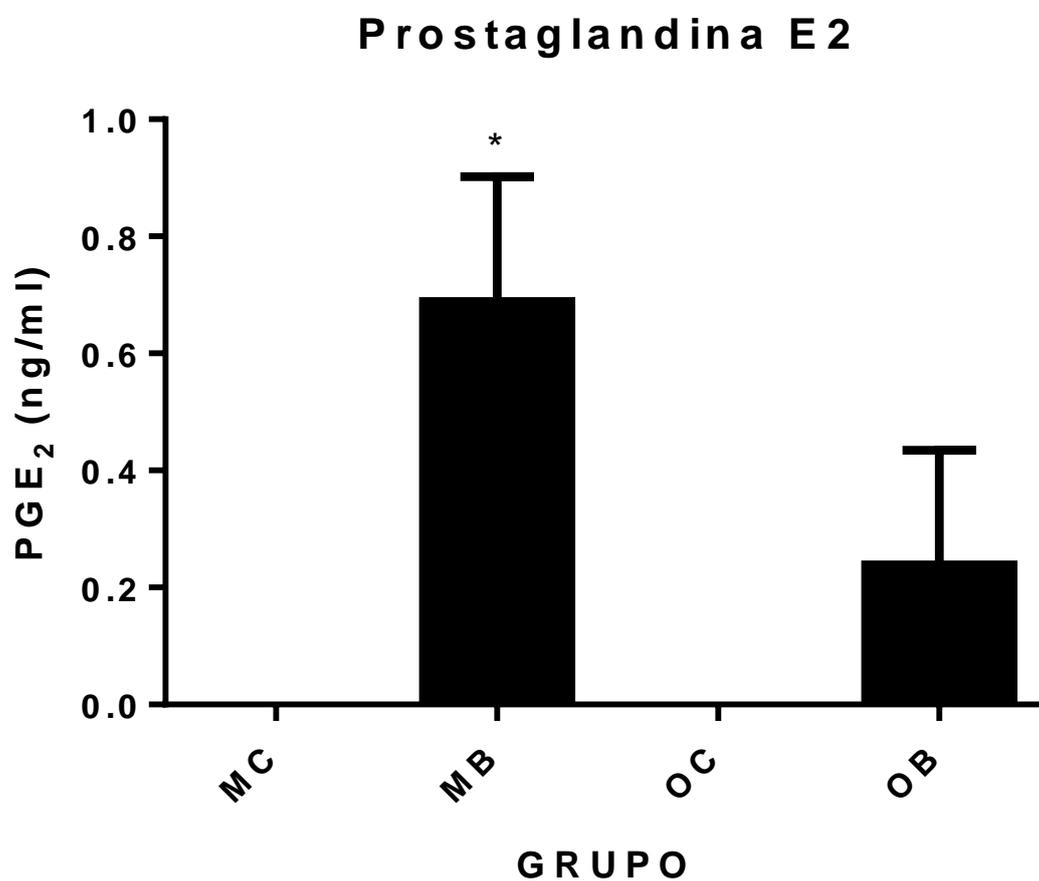
**Fig 14 – Formação de corpúsculos lipídicos frente à infecção por *Mycobacterium bovis* BCG em animais, T0, magros e obesos.** Animais ( $n \geq 3$ ) em tempo zero (A), dieta controle e dieta especial por três (B) e dois (C) meses receberam a inoculação de 100 ml de solução de BCG 10mg/ml e tiveram o número médio de corpúsculos lipídicos nos leucócitos recrutados estimados por microscopia de luz (coloração por ósmio). O símbolos (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos respectivos controles e os grupos marcados. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM.

#### **4.5 – Animais obesos apresentam menor produção de Prostaglandina E<sub>2</sub> frente à infecção por *Mycobacterium bovis* BCG**

A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que é uma pequena molécula derivada de ácido araquidônico (AA) produzida por ciclooxigenases, como por exemplo a ciclooxigenase constitutivamente ativa 1 (COX1), e COX-2 (PHIPS *et al*, 1991). A PGE<sub>2</sub> participa de diversos processos imunológicos, como recrutamento de leucócitos, (YU *et al*, 2008 ; NAKAYAMA *et al*, 2006), controle do balanço da resposta Th1/Th2, redução da capacidade citotóxica de linfócitos NK, pela redução da sensibilidade à IL-12, IL-15 e IL-2 e diminuição da produção de INF- $\gamma$  por estes (WALKER *et al*, 2004 ; JOSHI *et al*, 2001).

Na infecção por micobactérias, a PGE<sub>2</sub>, está intimamente relacionada com o aumento dos corpúsculos lipídicos, pois estas organelas são sítios de produção de PGE<sub>2</sub>, e o aumento da sua produção representa um fator de proteção para o patógeno (DÁVILA *et al*, 2006; ALMEIDA *et al*, 2009; MATTOS *et al*, 2010).

Para avaliar a produção de PGE<sub>2</sub> nos animais obesos, magros, lavado pleural foi coletado e processado para EIA (ensaio Imunoenzimático). Nossos dados indicam que, acompanhando nossos dados sobre a formação de corpúsculos lipídicos, que a infecção por BCG induziu a formação de PGE<sub>2</sub> nos animais magros, porém a produção de PGE<sub>2</sub> em animais obesos infectados é menor que em animais magros infectados (Figura 15).

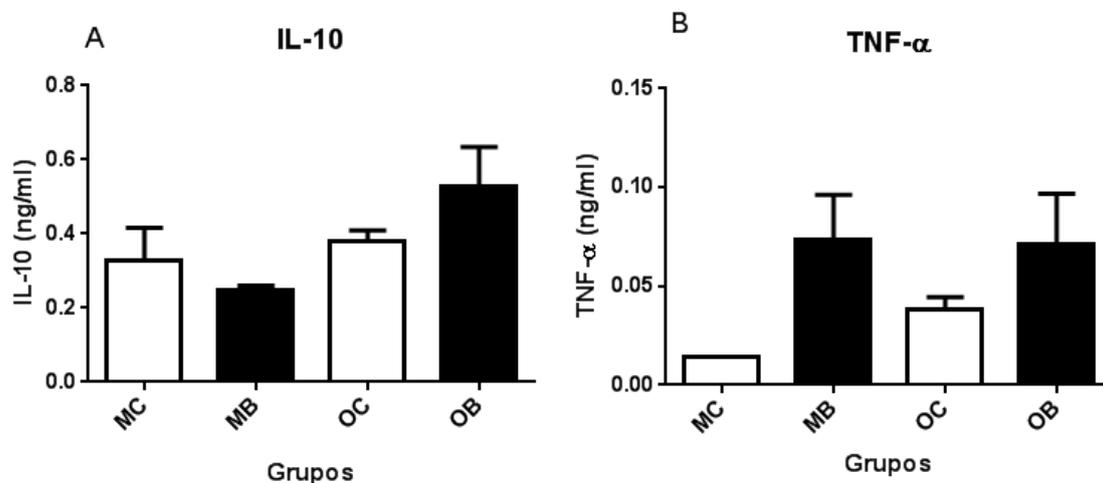


**Fig 15 - Quantificação da produção de prostaglandina E2 no lavado pleural.** Animais ( $n \geq 3$ ) receberam a inoculação de 100 ml de solução de BCG 10mg/ml e o lavado pleural coletado e centrifugado para coleta do sobrenadante. Prostaglandina E2 foi dosada por EIA neste material a 405nm. O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos seus respectivos controles. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM.

#### **4.6 – Durante infecção, animais obesos mesma produção de TNF- $\alpha$ que animais magros, porem maior produção de IL-10**

Apesar da literatura destacar a importância do TNF-  $\alpha$  para a progressão da infecção por *Mycobacterium bovis* e pelo *Mybocaterium tuberculosis* (KEANE *et al*, 2001), e que indivíduos obesos apresentam uma superexpressão dessa citocina, apresentando assim um quadro de baixa inflamação crônica (HOLLAND *et al*, 2011), nossos experimentos demonstram que a resposta menos agressiva demonstrada por animais obesos e por nós evidenciada parece ocorrer de maneira independente desta citocina, uma vez que seus níveis se mostraram iguais entre os animais magros e obesos infectados (Figura 15).

A IL-10, por sua vez, tem papel fundamental no desenvolvimento da tuberculose, pois em estágios iniciais da infecção, aparenta impedir a formação e maturação de granulomas fibróticos (CYKTOR *et al*, 2013), enquanto em estágios tardios favorece a reativação da infecção e o estabelecimento da tuberculose crônica (TURNER *et al*, 2002). Ao contrário do TNF-  $\alpha$  detectamos um aumento nos níveis de IL-10 no animal obeso infectado em relação ao animal magro infectado, indicando a importância desta na proteção inicial que os animais obesos aparentam ter frente a infecção (Figura 16).



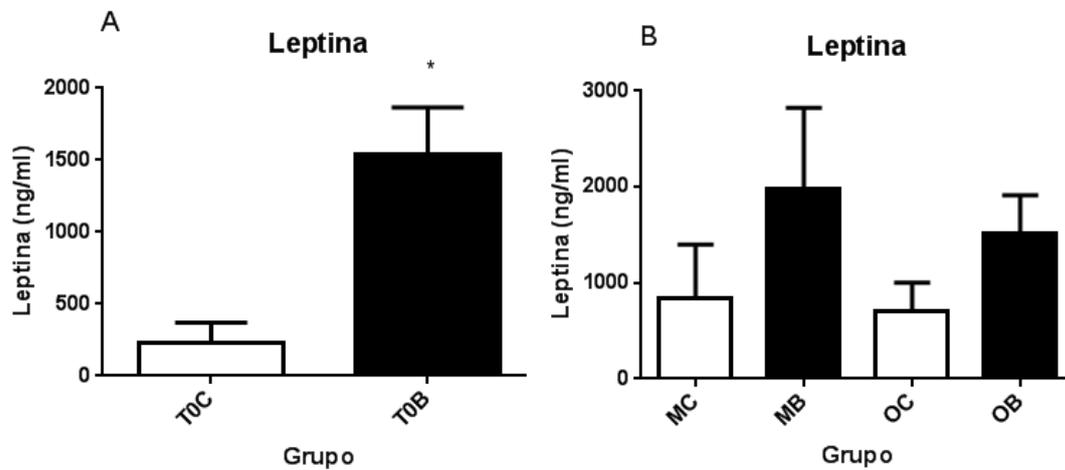
**Fig 16 – Quantificação da produção de citocinas no lavado pleural após 24h de infecção.** Animais ( $n \geq 3$ ) receberam a inoculação de 100 ml de solução de BCG 10mg/ml e o lavado pleural coletado e centrifugado para coleta do sobrenadante. IL-10 (A) e TNF- $\alpha$  (B) foram dosados por Elisa. O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos seus respectivos controles. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM.

#### **4.7 – Animais obesos apresentam uma menor produção de leptina e uma maior produção de adiponectina frente à infecção por *Mycobacterium bovis***

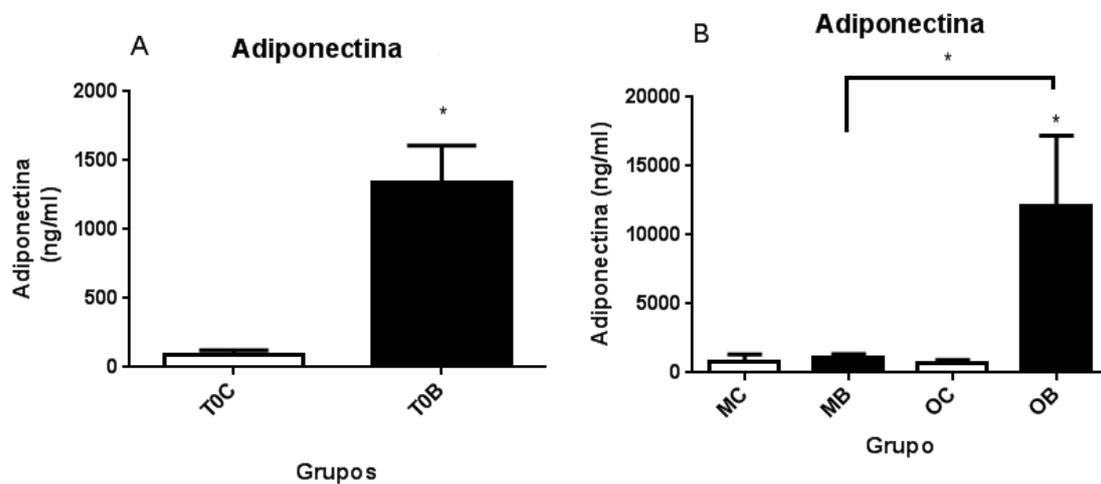
Leptina e adiponectinas são hormônios responsáveis respectivamente pela regulação do apetite e pela sensibilização à insulina sendo que em homens obesos. A resistência à leptina este é um fator importante no desenvolvimento da obesidade (OZATA *et al*, 1999) e os níveis séricos de adiponectina é consideravelmente menor que em homens magros (YANG *et al*, 2001).

Além destas funções, estes hormônios apresentam papéis importantes na regulação da resposta imunológica a diversos patógenos, e a literatura vem demonstrando que a leptina pode modular a produção de citocinas por macrófagos/monócitos, como por exemplo, aumenta a produção dependente de LPS de TNF-alfa, IL-6 e IL-12 (LOFFREDA *et al*, 1998 ; SANTOS-ALVAREZ *et al*, 1999), bem como pode ser estímulo pra formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE<sub>2</sub> (MAYA-MONTEIRO *et al*, 2008). A adiponectina por sua vez, de maneira geral, participa na expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e (WULSTER-RADCLIFF *et al*, 2004) e atua na supressão da via do NF-kB dependente de TNF-a apresentando um papel anti-inflamatório e anti-apoptótico (RAKATAZI *et al*, 2004).

Para avaliarmos a produção destes hormônios nos animais obesos, magros e em tempo zero, lavado pleural foi coletado, processado e estes foram dosados neste material por Elisa. Nossos dados apontam para uma maior produção de adiponectina (Figura 17) e uma menor produção de leptina (Figura 18) nos animais obesos infectados, indicando um perfil mais anti-inflamatório da resposta nos animais obesos.



**Fig 17 - Quantificação da produção de leptina no lavado pleural.** Animais ( $n \geq 3$ ) em tempo zero (A) e em dois meses (B) receberam a inoculação de 100 ml de solução de BCG 10mg/ml e o lavado pleural coletado e centrifugado para coleta do sobrenadante. Leptina foi dosada por Elisa. O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos seus respectivos controles. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM.



**Fig 18 - Quantificação da produção de adiponectina no lavado pleural.** Animais ( $n \geq 3$ ) em tempo zero (A) e em dois meses (B) receberam a inoculação de 100 ml de solução de BCG 10mg/ml e o lavado pleural coletado e centrifugado para coleta do sobrenadante. Adiponectina foi dosada por Elisa . O símbolo (\*) indica diferença significativa  $p \leq 0,05$  em relação aos seus respectivos controles e entre os MB e OB. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  EPM

## 5 - Discussão

A obesidade tomou proporções epidêmicas em todo o mundo, sendo associada a morte de quase 3 milhões de pessoas no mundo, sendo que hoje 12% da população mundial é considerada obesa e mais de 1,5 bilhões de pessoas estão em sobrepeso. Além disso, 44% dos casos de diabetes e 23% dos casos de doenças isquêmicas do coração, por exemplo, estão associados com o sobrepeso (OMS, 2013).

Hoje sabe-se que o tecido adiposo é um tecido ativo, constitutivamente inflamado e que a condição de obesidade está diretamente relacionada com a resposta imunológica à diversas doenças infecto-parasitárias (Karlsson e Beck, 2010). A literatura mostra que nesse tecido ocorre infiltração de macrófagos e estes, por estímulos locais, por exemplo a secreção de leptina (estímulo local no caso da ativação destes macrófagos), produzem constantemente TNF- $\alpha$ , gerando um quadro de inflamação crônica (KARLSSON E BECK, 2010). De fato, indivíduos obesos apresentam uma maior quantidade de proteína reativa C (CRP) circulante, IL-6 e de outros marcadores pró-inflamatórios, além do próprio TNF- $\alpha$  (DAS *et al*, 2002). Estes altos níveis de mediadores inflamatórios circulantes, estão ligados por exemplo, com o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças auto-imunes brandas (FORD, 2003). Além disto, pré-adipócitos tem a capacidade de realizar fagocitose frente a certos estímulos e compartilham com macrófagos constitutivamente ativos genes para certos fatores de transcrição, produção de citocinas e moléculas sinalizadoras de inflamação (MAKOWSKI *et al*, 2001 ; COUSIN *et al*, 1999). Como foi constatado, indivíduos obesos apresentam déficit de resposta primária ao vírus influenza e susceptibilidade a infecção por diversas bactérias, (KARLSSON E BECK, 2010), além de apresentarem maior risco de desenvolverem certos tipo de câncer (VONA DAVIS *et al*, 2013)

Com fins de estudar a relação da obesidade com a evolução da infecção por *Mycobacterium bovis* BCG, animais foram tratados com ração enriquecida com leite condensado e açúcar (hiperglicídica), por zero, dois ou três meses, com objetivo de que estes desenvolvessem um estado de sobrepeso. Animais controle receberam uma dieta controlada com ração comum. Estes animais tiveram seus pesos monitorados e, na data do experimento, suas gorduras perigonadal e retroperitoneal coletadas para avaliação do ganho de peso e tecido adiposo.

Apesar dos grupos magros e obesos não terem apresentado uma diferença significativa de peso, estes apresentaram uma diferença significativa na quantidade das gorduras localizadas, principalmente da gordura retroperitoneal, que em um indivíduo magro é praticamente ausente, indicando uma grande variação da quantidade de tecido adiposo entre os grupos, e que o estado de obesidade proposto foi atingido. Apesar da diferença do peso entre os animais em alimentação controle e os animais em tempo zero, a quantidade de gordura entre estes não variou significativamente, indicando que este peso final maior atingido pelos animais magros é decorrente de um ganho de massa magra e do próprio amadurecimento e desenvolvimento destes animais.

Atualmente compreende-se melhor as bases moleculares para a relação entre a obesidade e a diabetes e já foi demonstrado que a ativação de macrófagos pela via do receptores do tipo Nod (NLR), devido a sinais decorrentes da inflamação constitutiva gerada no tecido adiposo, ativam o inflamassoma NLRP3 e induzem a produção de IL-1B e IL-18 e estas citocinas representam estímulos para apoptose de células B pancreáticas ( ZHOU *et al*, 2011).

Tendo estes dados e o conhecimento da relação epidemiológica entre obesidade e diabetes em vista, para avaliarmos se com a dieta, além do ganho de peso, os animais apresentavam alguma alteração na glicemia, foi acompanhada glicemia dos animais durante a execução do experimento. Com a realização da curva glicêmica e da medição da área sob os dois pontos (glicemia pré prandial e pós prandial), pudemos concluir que nem 2, nem 3

meses de dieta especial controlada, são suficientes pra indução de um estado de diabetes em camundongos C57/BL6. A diminuição da área sob a curva, dos animais em tratamento em relação aos animais em tempo zero, pode estar indicando um estado de pré diabetes, sendo necessário a dosagem da insulina sérica para a avaliação deste estado. De fato, é demonstrado na literatura que animais C57/BL6 podem corresponder a um modelo válido de diabetes experimental frente a uma ração especial hipergordurosa em um tratamento mais longo, de 4 meses, pois esta condição leva mais tempo pra ser desenvolvida que o estado de sobrepeso (SCHREYER *et al*, 1998).

Dados do grupo demonstram que na resposta a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos C57/BL6, ocorre o influxo de leucócitos para a cavidade intrapleural. Inicialmente nota-se um grande aumento da migração de neutrófilos, seguida de um aumento na migração de eosinófilos. Neutrófilos são leucócitos de meia vida curta, e comprometidos com a resposta rápida à antígenos e no caso da infecção experimental por *Mycobacterium bovis* os neutrófilos são importantes pois são capazes de fagocitar o bacilo e liberar potentes mediadores inflamatórios que dão seguimento à resposta imunológica frente ao estímulo (D'AVILA *et al*, 2006). Por outro lado, dados também do grupo demonstram que o *Mycobacterium bovis* é capaz de promover a apoptose destes neutrófilos e que este processo leva a indução da formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos que fagocitam estes corpos apoptóticos, um processo que, de maneira geral, favorece neste caso o patógeno (D'AVILA *et al*, 2006). Eosinófilos por sua vez, estão associados geralmente a superfícies do corpo que estão em constante contato com o meio externo, como por exemplo, o trato respiratório e estão mais comumente envolvidos em respostas a helmintos e respostas alérgias, apesar de terem papéis importantes em outras repostas (ADANKO *et al*, 2005). Eosinofilia é também característica de infecções por *Mycobacterium*, e o recrutamento destes leucócitos é comumente associado ao crescimento irrestrito do bacilo em animais susceptíveis à infecção, bem como é um processo característico em indivíduos imunodeficientes com uma infecção secundária por *Mycobacterium tuberculosis* (WERNECK BARROSO *et al*, 2000

; ELLIOT *et al*, 2003), sugerindo que este leucócito está associado a um processo de susceptibilidade frente a estas infecções. Além disso, em termos totais, o recrutamento celular aumenta consideravelmente até o tempo de 24h de infecção, podendo perdurar por até 15 dias, sendo uma característica marcante de todo o processo. (D'AVILA *et al*, 2006; D'AVILA *et al*, 2007).

A fim de investigar a influência da obesidade na evolução da infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG, os indivíduos tratados com alimentação especial controlada foram inoculados com BCG e tiveram, após 24 horas de infecção, seu lavado pleural coletado e analisado quantitativamente e, posteriormente, qualitativamente por microscopia de luz. Nossos dados demonstram uma redução significativa no influxo total de leucócitos que migraram para a cavidade pleural, bem como redução do influxo de neutrófilos e eosinófilos em indivíduos obesos em comparação com indivíduos magros e em T0 . Estes dados sugerem que, os indivíduos obesos apresentam uma menor resposta inflamatória, ou uma evolução mais lenta da resposta frente à infecção por BCG e que conseqüentemente, os processos característicos de eosinofilia e apoptose de neutrófilos, que aparentam favorecer o patógeno, ocorrem em menor frequência nos animais obesos. Em relação aos animais em tempo zero, mesmo os animais magros apresentaram uma redução significativa destes recrutamentos, indicando que mesmo um ganho de massa magra e a idade, estão influenciando também diretamente na evolução da infecção.

Levando em consideração que singularmente, na tuberculose, a fisiopatologia se desenvolve a ponto de que a própria resposta imunológica, por formação de fibromas e granulomas, é a causadora dos danos característicos da doença (perda de função e lesão do tecido pulmonar, levando a insuficiências respiratórias graves, por exemplo) (ERNST, 2012), o fato dos indivíduos obesos apresentarem uma resposta mais branda ao patógeno, pode sugerir que a maior quantidade de tecido adiposo desfavorece o BCG. Além disto, processos característicos que favorecem o patógeno, como eosinofilia e apoptose de neutrófilo, sofrem uma redução como consequência desse menor recrutamento leucocitário, sendo também outro fator de desfavorecimento ao

*Mycobacterium bovis*. Estes dados vão ao encontro a estudos que demonstram que a mortalidade em indivíduos obesos soropositivos tuberculosos é até dez vezes menor que nos indivíduos magros soropositivos e tuberculosos, indicando que de algum modo a obesidade exerce um efeito favorável quanto a evolução da doença (HANRAHAN, 2010) Embora trabalhos demonstrem que células do tecido adiposo podem ser reservatório utilizado pelo *M. tuberculosis* para a persistência por longo tempo, e podendo ser um possível sítio de reativação da doença (PEYRON *et al.*, 2009).

Resultados do grupo indicam que a infecção *por Mycobacterium bovis* em camundongos C57/BL6 induz a formação de corpúsculos lipídicos e estes são sítios de produção de eicosanoides, resultando na indução da produção de PGE<sub>2</sub>, por exemplo. (D'AVILA *at al*, 2006; ALMEIDA *et al*, 2009). A conversão enzimática do ácido araquidônico livre em seus metabólitos oxigenados (PGE<sub>2</sub>) no interior dos corpúsculos lipídicos parece favorecer a sobrevivência do patógeno no interior do fagócito, uma vez que o ácido araquidônico livre seria capaz de estimular a nucleação da actina e a maturação do fagossoma nas células infectadas, resultando em significativa morte da micobacteria (ANES *et al.*, 2003) A literatura mostra também que a supressão da produção de prostaglandina pelos corpúsculos lipídicos, desfavorece a micobactéria, inibindo a replicação do bacilo (D'AVILA *et al*, 2006 ; ALMEIDA *et al*, 2009). Desta forma, o aumento da capacidade dos macrófagos de produzir PGE<sub>2</sub> derivada dos corpúsculos lipídicos tem sido relacionado com a inibição de uma resposta protetora por parte do hospedeiro, modulando negativamente a função do macrófago e favorecendo a sobrevivência e replicação do patógeno no interior do fagócito.

Afim de comparar a indução da formação destas organela entre os animais magros e obesos, lâminas de lavado pulmonar fixadas em formalina foram coradas com tetróxido de ósmio e analisadas por microscopia de luz. A quantificação média de corpúsculos lipídicos por individuo foi realizada e foi visto que existe uma redução na formação destas organelas em células dos indivíduos obesos em relação aos indivíduos magros. Estes dados, vão ao encontro das contagens do recrutamento de células para a cavidade pleural, indicando novamente uma evolução mais lenta da doença em indivíduos

obesos. Em relação aos indivíduos em tempo zero, ambos os grupos com alimentação controlada exibiram uma diminuição no número médio de corpúsculos lipídicos, indicando novamente o efeito da idade e do ganho de peso decorrente do amadurecimento e desenvolvimento destes animais.

Foi avaliada também a produção da Prostaglandina E2 entre os animais magros e obesos e condizendo com os resultados da formação de corpúsculos lipídicos, notamos uma menor produção deste eicosanóide nos animais obesos em relação aos animais magros, indicando então novamente, um desfavorecimento à sobrevivência do patógeno nos animais obesos em relação aos magros.

Ainda tendo em vista o fato de que em diversas infecções a formação de corpúsculos lipídicos favorecem o patógeno (BOZZA *et al*, 2007), interessantemente, nossos resultados sugerem que a obesidade de alguma maneira pode modular negativamente a evolução da tuberculose experimental.

Para buscar compreender quais fatores decorrentes da adiposidade exacerbada nos indivíduos obesos poderiam estar influenciando nessa diferença de resposta entre os grupos, nós avaliamos fatores inflamatórios chave para diversas respostas e que são reconhecidamente alterados em consequência da obesidade, como citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ), anti-inflamatórias (IL-10) e adipocinas (Leptina e Adiponectina).

Leptina e Adiponectina são hormônios protéicos secretados por adipócitos relacionados respectivamente com o balanço energético, ingestão de alimento e o número de adipócitos em humanos e com a sensibilização à insulina, regulação da glicemia e catabolismo de ácidos graxos (VEGA E GRUNDY, 2013). Além disto, estes hormônios apresentam efeitos importantes para processos imunológicos, sendo que a adiponectina apresenta, de maneira geral, um perfil anti-inflamatório atuando na supressão da via do NF-kB dependente de TNF- $\alpha$ , interrompendo a sinalização dependente de cAMP, inibindo assim a transcrição de genes pró-inflamatórios (RAKATAZI *et al*, 2004) e induzindo a expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-1RA (WULSTER-RADCLIFF *et al*, 2004).

A leptina por sua vez apresenta um perfil mais pró-inflamatório e é capaz de ativar macrófagos e induzir a formação de corpúsculos lipídicos por um mecanismo dependente da ativação da via PI3K/mTOR (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008), ela também modula a produção de citocinas por macrófagos/monócitos, como por exemplo, aumenta a produção dependente de LPS de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 em macrófagos, participa da quimiotaxia de neutrófilos e representa uma fonte importante de estímulos pró-sobrevivência de tímócitos durante a maturação de células T (GENONI *et al.*, 2014).

Para avaliação do efeito destas adipocinas perante a resposta diferenciada em animais obesos (em relação aos animais magros), o lavado pleural coletado foi armazenado e posteriormente processado para quantificação por ELISA. Nossas dosagens demonstraram que animais obesos apresentam uma tendência à menor produção de leptina em relação aos animais magros e uma produção significativamente maior de adiponectina. Estes dados vão ao encontro do perfil de resposta por nós antes traçado, pois como dito, a leptina é importante na formação de corpúsculos lipídicos e é um importante fator na quimiotaxia de neutrófilos e sua menor quantidade nos animais obesos ajuda a explicar o porque destes apresentarem menor formação destas organelas e menor recrutamento de tais leucócitos. Por outro lado, tendo em vista a capacidade imunossupressora parcial da adiponectina, a sua maior produção nos animais obesos ajudaria a explicar uma resposta mais branda destes frente a infecção pelo BCG, além de ser um fator anti-apoptótico, o que pode levar a menor taxa de apoptose de neutrófilos que é, como já dito, um relevante processo de favorecimento do patógeno.

Em seguida, avaliamos também, a produção nestes animais das citocinas IL-10, que é influenciada pelos níveis de adiponectina, e TNF- $\alpha$ , que é influenciada pelos níveis de leptina e pela condição de obesidade. A IL-10 em estágios iniciais da infecção, aparenta impedir a formação e maturação de granulomas fibróticos (CYKTOR *et al.*, 2013), ou seja, de certo modo é responsável pelo atraso do desenvolvimento da doença e o TNF- $\alpha$  contribui para a formação e manutenção do granuloma, melhor eliminação do patógeno,

ativação de macrófagos e facilitação da fagocitose destes (KEANE *et al*, 2001).

Para avaliação do efeito destas citocinas perante a resposta diferenciada em animais obesos (em relação aos animais magros), o lavado pleural coletado foi armazenado e posteriormente processado para quantificação por ELISA. Nossas dosagens demonstraram que os níveis de produção de TNF- $\alpha$  nos animais obesos foram iguais aos dos animais magros, porém a produção de IL-10 foi significativamente superior, indicando que, a resposta mais lenta e aparentemente menos agressiva que estes animais apresentam, não se deve a redução de uma importante citocina pró-inflamatória, mas sim a maior expressão de uma citocina anti-inflamatória. Sabendo que, os níveis de IL-10 estão relacionados com os níveis de adiponectina e que esta é responsável pelo atraso no desenvolvimento da tuberculose, estes dados novamente vão ao encontro dos nossos outros dados, apontando para, de maneira geral, um perfil mais anti-inflamatório de resposta menos agressiva por parte dos animais obesos, confirmando a indicação de que a obesidade modula negativamente a infecção experimental pelo *Mycobacterium bovis*.

De maneira geral, o indivíduo obeso, apresentando um padrão mais parecido aos indivíduos controles não infectados, e conseqüentemente, menor expressão de fatores que caracteristicamente favorecem o BCG parecem apresentar um desenvolvimento mais lento da doença e proporcionar uma menor sobrevivência do bacilo no portador, pelo menos com relação aos parâmetros analisados até o momento. Porém por outro lado, a infecção pode ficar latente nestes indivíduos, e ser reativada posteriormente. Sendo assim, mais estudos, como por exemplo, quantificação de viabilidade bacteriana, são necessários para a análise do significado funcional da menor resposta inflamatória observada nos animais obesos .

## 6 - Conclusão

Os resultados obtidos em nosso trabalho nos permitem concluir que, o tratamento de camundongos C57/BL6 com dieta hiperglicídica por 3 meses é capaz de induzir nestes um grande acúmulo de tecido adiposo característico de um quadro de obesidade. Esta por sua vez, é capaz de modular negativamente a resposta imunológica frente à infecção por *Mycobacterium bovis*, decorrendo em uma resposta mais branda, com menor recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório e menor produção de corpúsculos lipídicos e PGE<sub>2</sub>, e aparentemente atrasada em consequência de uma menor expressão de fatores pró-inflamatórios, como a leptina, e maior expressão de fatores anti-inflamatórios, como a IL-10 e a adiponectina. Com isso, animais obesos apresentaram menos fatores de favorecimento do patógeno, como eosinofilia, apoptose de neutrófilos (devido ao menor recrutamento destes), formação de corpúsculos e metabolismo de ácido araquidônico, indicando que estes animais oferecem um ambiente menos favorável para o BCG. Entretanto, novos estudos, como testes de viabilidade bacteriana e análise histológica pulmonar destes indivíduos, se fazem necessários para avaliarmos mais efetivamente os efeitos dessas alterações derivadas da obesidade na sintomatologia da tuberculose.

## 7 - Referências

ADAMKO, D. J., ODEMUYIWA, S. O., VETHANAYAGAM, D., & MOQBEL, R. (2005). The rise of the phoenix: the expanding role of the eosinophil in health and disease. **Allergy**, 60(1), 13-22.

ALMEIDA, PE; SILVA, AR; MAYA-MONTEIRO, CM; TOROCHSIK,D; D`AVILA, H; DEZSO",B; MAGALHAES, KG; CASTRO-FARIA-NETO, H. C; NAGY,L; BOZZA, PT. (2009). Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activatedreceptor expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis1. **Journal of Immunology**, 183: 1337-1345.

ANES, E., KÜHNEL, M. P., BOS, E., MONIZ-PEREIRA, J., HABERMANN, A., & GRIFFITHS, G. (2003). Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. **Nature cell biology**, 5(9), 793-802.

BOZZA, P.T., MELO, R.C.N. AND BANDEIRA-MELO, C. (2007). Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 113, 30-49.

BRIGHTBILL, H. D., LIBRATY, D. H., KRUTZIK, S. R., YANG, R. B., BELISLE, J. T., BLEHARSKI, J. R., ... & MODLIN, R. L. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, 285(5428), 732-736.

CALMETTE, A., & GUÉRIN, C. (1924). Vaccination des bovidés contre la tuberculose et méthode nouvelle de prophylaxie de la tuberculose bovine. **Ann. Inst. Pasteur**, 38(5), 371.

CAMPBELL, P. J., MORLOCK, G. P., SIKES, R. D., DALTON, T. L., METCHOCK, B., STARKS, A. M., ... & POSEY, J. E. (2011). Molecular detection of mutations associated with first-and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 55(5), 2032-2041.

CARDONA, P.J., LLATJOS, R., GORDILLO, S., DIAZ, J., OJANGUREN, I., ARIZA, A. AND AUSINA, V. (2000). Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand J Immunol** 52, 156-163.

CHATTERJEE, T. K., STOLL, L. L., DENNING, G. M., HARRELSON, A., BLOMKALNS, A. L., IDELMAN, G., ... & WEINTRAUB, N. L. (2009). Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes influence of high-fat feeding. **Circulation research**, 104(4), 541-549.

CLIFF, J. M., LEE, J. S., CONSTANTINOU, N., CHO, J. E., CLARK, T. G., RONACHER, K., ... & DOCKRELL, H. M. (2013). Distinct phases of blood gene expression pattern through tuberculosis treatment reflect modulation of the humoral immune response. **Journal of Infectious Diseases**, 207(1), 18-29.

COLLEEN F. HANRAHANA, JONATHAN E. GOLUB, LERATO MOHAPI, NKEKO TSHABANGU, TEBOGO MODISENYANE, RICHARD E. CHAISSON, GLENDA E. GRAY, JAMES A. MCINTYRE, AND NEIL A. MARTINSON. 2010. Body mass index and risk of tuberculosis and death. **AIDS** 2010 June 19; 24(10): 1501–1508.

COOPER, A. M. (2009). Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annual review of immunology**, 27, 393-422.

COUSIN, B., MUNOZ, O., ANDRÉ, M., FONTANILLES, A. M., DANI, C., COUSIN, J. L., ... & ENICAUD, L. P. (1999). A role for preadipocytes as macrophage-like cells. **The FASEB Journal**, 13(2), 305-312.

CYKTOR, J. C., CARRUTHERS, B., KOMINSKY, R. A., BEAMER, G. L., STROMBERG, P., & TURNER, J. (2013). IL-10 inhibits mature fibrotic granuloma formation during Mycobacterium tuberculosis infection. **The Journal of Immunology**, 190(6), 2778-2790.

DAS, U. N. (2002). Metabolic Syndrome X and low-grade systemic inflammation. In *A Perinatal Strategy For Preventing Adult Disease: The Role Of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids*. **Springer US** (pp. 61-93).

D'AVILA, H., MAYA-MONTEIRO, C.M. AND BOZZA, P.T. (2008a). Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **Int Immunopharmacol** 8, 1308-1315.

D'AVILA, H.; FREIRA-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R. ; TEIXEIRA, L. ; BARJA-FIDALGO, C.; SILVA, A. R. ; MELO, R. C. N. ; DOSREIS, G. A. ; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. ; BOZZA, P. T (2011). Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with PGE2 generation and increased parasite growth. **Journal of Infectious Disease**, v. 204, p. 951-961.

DORHOI, A., REECE, S. T., & KAUFMANN, S. H. (2011). For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. **Immunological reviews**, 240(1), 235-251.

DVORAK, AM; WELLER, PF; HARVEY, V S; MORGAN, E; DVORAK, HF. 1993. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. **Int Arch Allergy Immunol** 101: 136-142.

ELLIOTT, A. M., KYOSIIMIRE, J., QUIGLEY, M. A., NAKIYINGI, J., WATERA, C., BROWN, M., ... & WHITWORTH, J. A. (2003). Eosinophilia and progression to active tuberculosis in HIV-1-infected Ugandans. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 97(4), 477-480.

ERIK A KARLSSON AND MELINDA A BECK. (2010). The burden of obesity on infectious disease. **Exp Biol Med (Maywood)** 235: 1412.

FARHAT, M. R., SHAPIRO, B. J., KIESER, K. J., SULTANA, R., JACOBSON, K. R., VICTOR, T. C., ... & MURRAY, M. (2013). Genomic analysis identifies

targets of convergent positive selection in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature genetics**, 45(10), 1183-1189.

FORD, E. S. (2003). The metabolic syndrome and C-reactive protein, fibrinogen, and leukocyte count: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Atherosclerosis**, 168(2), 351-358.

FRIEDEN, T.R., STERLING, T.R., MUNSIFF, S.S., WATT, C.J. AND DYE, C. (2003). Tuberculosis. **Lancet** 362, 887-899.

GALAGAN, J. E., MINCH, K., PETERSON, M., LYUBETSKAYA, A., AZIZI, E., SWEET, L., ... & SCHOOLNIK, G. K. (2013). The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. **Nature**.

GENONI, G., PRODAM, F., MAROLDA, A., GIGLIONE, E., DEMARCHI, I., BELLONE, S., & BONA, G. (2014). Obesity and infection: two sides of one coin. **European journal of pediatrics**, 173(1), 25-32.

GOLDBERG, R. B. (2009). Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 94(9), 3171-3182.

GOLDBERG, R.B. (2009) Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. **J Clin Endocrinol Metab**. 2009 Sep;94(9):3171-82

GOPAL, R., MONIN, L., TORRES, D., SLIGHT, S., MEHRA, S., MCKENNA, K. C., ... & KHADER, S. A. (2013). S100A8/A9 Proteins Mediate Neutrophilic Inflammation and Lung Pathology during Tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 188(9), 1137-1146.

GUILHERME, A., VIRBASIOUS, J. V., PURI, V., & CZECH, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 9(5), 367-377.

GUPTA, A., WOOD, R., KAPLAN, R., BEKKER, L. G., & LAWN, S. D. (2013). Prevalent and incident tuberculosis are independent risk factors for mortality among patients accessing antiretroviral therapy in South Africa. **PloS one**, 8(2), e55824.

D'AVILA, H., ROQUE, N. R., CARDOSO, R. M., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., MELO, R. C., & BOZZA, P. T. (2008). Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E2 production by macrophages. **Cellular microbiology**, 10(12), 2589-2604.

D'ÁVILA, H., ALMEIDA, P. E., ROQUE, N. R., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., & BOZZA, P. T. (2007). Toll-like receptor-2-mediated CC chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by Mycobacterium bovis BCG pleurisy. **Infection and immunity**, 75(3), 1507-1511.

D'AVILA, H., MELO, R. C., PARREIRA, G. G., WERNECK-BARROSO, E., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., & BOZZA, P. T. (2006). Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **The Journal of Immunology**, 176(5), 3087-3097.

HOLLAND, W. L., MILLER, R. A., WANG, Z. V., SUN, K., BARTH, B. M., BUI, H. H., ... & SCHERER, P. E. (2011). Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. **Nature medicine**, 17(1), 55-63.

HOTAMISLIGIL, G. S., SHARGILL, N. S., & SPIEGELMAN, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259(5091), 87-91.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity linked insulin resistance. **Science** 259:87–91, 1993

HUBBARD, L. L., BALLINGER, M. N., THOMAS, P. E., WILKE, C. A., STANDIFORD, T. J., KOBAYASHI, K. S., ... & MOORE, B. B. (2010). A role for IL-1 receptor-associated kinase-M in prostaglandin E2-induced immunosuppression post-bone marrow transplantation. **The Journal of Immunology**, 184(11), 6299-6308.

RANGEL MORENO, J., ESTRADA GARCÍA, I., DE LA LUZ GARCÍA HERNÁNDEZ, M., AGUILAR LEON, D., MARQUEZ, R., & HERNÁNDEZ PANDO, R. (2002). The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, 106(2), 257-266.

JOEL D. ERNST. 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature reviews immunology** volume 12 august 2012 : 581.

JOHANSSON, J. U., PRADHAN, S., LOKTEVA, L. A., WOODLING, N. S., KO, N., BROWN, H. D., ... & ANDREASSON, K. I. (2013). Suppression of Inflammation with Conditional Deletion of the Prostaglandin E2 EP2 Receptor in Macrophages and Brain Microglia. **The Journal of Neuroscience**, 33(40), 16016-16032.

JOSHI, P. C., ZHOU, X., CUCHENS, M., & JONES, Q. (2001). Prostaglandin E2 suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common  $\gamma$ -chain. **The Journal of Immunology**, 166(2), 885-891.

JOUNG, S. M., JEON, S. J., LIM, Y. J., LIM, J. S., CHOI, B. S., CHOI, I. Y., ... & RYOO, S. W. (2013). Complete genome sequence of Mycobacterium bovis BCG Korea, the Korean vaccine strain for substantial production. **Genome announcements**, 1(2), e00069-13.

KALINSKI, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **The Journal of Immunology**, 188(1), 21-28.

KAWAI, T., & AKIRA, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, 11(5), 373-384.

Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., ... & Braun, M. M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor  $\alpha$ -neutralizing agent. *New England Journal of Medicine*, 345(15), 1098-1104.

KHADER, S. A., BELL, G. K., PEARL, J. E., FOUNTAIN, J. J., RANGEL-MORENO, J., CILLEY, G. E., ... & COOPER, A. M. (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nature immunology**, 8(4), 369-377.

KIM MJ, WAINWRIGHT HC, LOCKETZ M, BEKKER LG, WALTHER GB, DITTRICH C, VISSER A, WANG W, HSU FF, WIEHART U, TSENOVA L, KAPLAN G, RUSSELL DG. (2010). Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. **EMBO Mol. Med.**, 1

KIPNIS, A., BASARABA, R. J., ORME, I. M., & COOPER, A. M. (2003). Role of chemokine ligand 2 in the protective response to early murine pulmonary tuberculosis. **Immunology**, 109(4), 547-551.

KUMAR, N. P., GOPINATH, V., SRIDHAR, R., HANNA, L. E., BANUREKHA, V. V., JAWAHAR, M. S., ... & BABU, S. (2013). IL-10 Dependent Suppression of Type 1, Type 2 and Type 17 Cytokines in Active Pulmonary Tuberculosis. **PloS one**, 8(3), e59572.

LAM, Q. L., & LU, L. (2007). Role of leptin in immunity. **Cell Mol Immunol**, 4(1), 1-13.

LEE, Y. A., CHOI, H. M., LEE, S. H., YANG, H. I., YOO, M. C., HONG, S. J., & KIM, K. S. (2012). Synergy between adiponectin and interleukin-1 $\beta$  on the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in fibroblast-like synoviocytes. **Experimental & molecular medicine**, 44(7), 440-447.

LEITE, MILANE S; PACHECO, PATRÍCIA; GOMES, RACHEL N; GUEDES, ALEXANDRE ; CASTRO-FARIA-NETO, HUGO ; BOZZA, PATRÍCIA T; KOATZ, VERA LÚCIA G. 2005. Mechanisms of Increased Survival After Lipopolysaccharide-Induced Endotoxic Shock in Mice Consuming Olive Oil-Enriched Diet. *Shock*: February 2005 - Volume 23 - Issue 2 - pp 173-178.

LEUNG, C. C., LAM, T. H., CHAN, W. M., YEW, W. W., HO, K. S., LEUNG, G., ... & CHANG, K. C. (2007). Lower risk of tuberculosis in obesity. **Archives of internal medicine**, 167(12), 1297-1304.

LOCKHART, E., GREEN, A. M., & FLYNN, J. L. (2006). IL-17 production is dominated by  $\gamma\delta$  T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. **The Journal of Immunology**, 177(7), 4662-4669.

LOFFREDA, S., YANG, S. Q., LIN, H. Z., KARP, C. L., BRENGMAN, M. L., WANG, D. J., ... & DIEHL, A. M. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. **The FASEB Journal**, 12(1), 57-65.

MAKOWSKI, L., BOORD, J. B., MAEDA, K., BABAEV, V. R., UYSAL, K. T., MORGAN, M. A., ... & LINTON, M. F. (2001). Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. **Nature medicine**, 7(6), 699-705.

MARTIN, S P; PIERCE, C H ; MIDDLEBROOK, G; DUBOS, R J. (1950). The effect of tubercle bacilli on the PMN of normal animals. **J Exp Med**, 91; 381-91.

MATSUZAWA, Y. (2006). Therapy insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. **Nature clinical practice Cardiovascular medicine**, 3(1), 35-42.

MATTOS, K. A., D'AVILA, H., RODRIGUES, L. S., OLIVEIRA, V. G., SARNO, E. N., ATELLA, G. C., ... & PESSOLANI, M. C. V. (2010). Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. **Journal of leukocyte biology**, 87(3), 371-384.

MAYA-MONTEIRO, C.M., ALMEIDA, P.E., D'AVILA, H., MARTINS, A.S., REZENDE, A.P., CASTRO-FARIA-NETO, H. AND BOZZA, P.T. (2008). Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. **J Biol Chem** 283, 2203-2210

MELO, R. C., SABBAN, A., & WELLER, P. F. (2006). Leukocyte lipid bodies: inflammation-related organelles are rapidly detected by wet scanning electron microscopy. **Journal of lipid research**, 47(11), 2589-2594.

MURPHY, D.J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Prog Lipid Res** 40, 325-438.

NAKAYAMA, T., MUTSUGA, N., YAO, L., & TOSATO, G. (2006). Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. **Journal of leukocyte biology**, 79(1), 95-104.

NEUFERT, C., PAI, R. K., NOSS, E. H., BERGER, M., BOOM, W. H., & HARDING, C. V. (2001). Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. **The Journal of Immunology**, 167(3), 1542-1549.

NIDHI KAPOOR, SANTOSH PAWAR, TATIANA D. SIRAKOVA, CHIRAJYOTI DEB, WILLIAM L. WARREN, PAPPACHAN E. KOLATTUKUDY. 2013. Human Granuloma In Vitro Model, for TB Dormancy and Resuscitation. **PLoS ONE** 8(1): e53657. doi:10.1371/journal.pone.0053657

OZATA, M., OZDEMIR, I. C., & LICINIO, J. (1999). Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 84(10), 3686-3695.

PACHECO, P., BOZZA, F.A., GOMES, R.N., BOZZA, M., WELLER, P.F., CASTRO-FARIA-NETO, H.C. AND BOZZA, P.T. (2002). Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. **J Immunol** 169, 6498-6506.

PALMER, C. E., JABLON, S., & EDWARDS, P. Q. (1957). Tuberculosis morbidity of young men in relation to tuberculin sensitivity and body build. **American review of tuberculosis**, 76(4), 517.

PANDEY, A. K., & SASSETTI, C. M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105(11), 4376-4380.

PENIDO, C., VIEIRA-DE-ABREU, A., BOZZA, M. T., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., & BOZZA, P. T. (2003). Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on  $\gamma\delta$  T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin. **The Journal of Immunology**, 171(12), 6788-6794.

PERSSON, A., BLOMGRAN-JULINDER, R., EKLUND, D., LUNDSTRÖM, C., & STENDAHL, O. (2009). Induction of apoptosis in human neutrophils by Mycobacterium tuberculosis is dependent on mature bacterial lipoproteins. **Microbial pathogenesis**, 47(3), 143-150.

PEYRON P, VAUBOURGEIX J, POQUET Y, LEVILLAIN F, BOTANCH C, BARDOU F, DAFFÉ M, EMILE JF, MARCHOU B, CARDONA PJ, DE CHASTELLIER C, ALTARE F. (2008). Foamy macrophages from tuberculous

patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. **PLoS Pathog.**, 11:e1000204

PEYRON P, VAUBOURGEIX J, POQUET Y, LEVILLAIN F, BOTANCH C, BARDOU F, DAFFÉ M, EMILE JF, MARCHOU B, CARDONA PJ, DE CHASTELLIER C, ALTARE F. (2008). Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. **PLoS Pathog.**, 11:e1000204

POKKALI, S., DAS, S. D., & SELVARAJ, A. (2009). Differential upregulation of chemokine receptors on CD56+ NK cells and their transmigration to the site of infection in tuberculous pleurisy. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 55(3), 352-360.

RAKATZI, I., MUELLER, H., RITZELER, O., TENNAGELS, N., & ECKEL, J. (2004). Adiponectin counteracts cytokine-and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. **Diabetologia**, 47(2), 249-258.

REECE, S. T., & KAUFMANN, S. H. (2012). Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis?. **Current opinion in microbiology**, 15(1), 63-70.

REILING, N., HÖLSCHER, C., FEHRENBACH, A., KRÖGER, S., KIRSCHNING, C. J., GOYERT, S., & EHLERS, S. (2002). Cutting edge: Toll-like receptor (TLR) 2-and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to

airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of immunology**, 169(7), 3480-3484.

RIBEIRO-RODRIGUES, R., JOHNSON, J. L., RIBEIRO, F., PALACI, M., SÁ, R. T., MACIEL, E. L., ... & HIRSCH, C. S. (2002). Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, 9(4), 818-823.

SAMARAS, K., BOTELHO, N. K., CHISHOLM, D. J., & LORD, R. V. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. **Obesity**, 18(5), 884-889.

SANTOS-ALVAREZ, J., GOBERNA, R., & SÁNCHEZ-MARGALET, V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. **Cellular immunology**, 194(1), 6-11.

SCHREYER, S. A., WILSON, D. L., & LEBOEUF, R. C. (1998). C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 136(1), 17-24.

SKÖLD, M., & BEHAR, S. M. (2008). Tuberculosis triggers a tissue-dependent program of differentiation and acquisition of effector functions by circulating monocytes. **The Journal of Immunology**, 181(9), 6349-6360.

Snijdewint, F. G., Kaliński, P., Wierenga, E. A., Bos, J. D., & Kapsenberg, M. L. (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *The Journal of Immunology*, *150*(12), 5321-5329.

TURNER, J., GONZALEZ-JUARRERO, M., ELLIS, D. L., BASARABA, R. J., KIPNIS, A., ORME, I. M., & COOPER, A. M. (2002). In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. **The Journal of Immunology**, *169*(11), 6343-6351.

TVERDAL, A. (1986). Body mass index and incidence of tuberculosis. **European journal of respiratory diseases**, *69*(5), 355-362.

VEGA, G. L., & GRUNDY, S. M. (2013). Metabolic risk susceptibility in men is partially related to adiponectin/leptin ratio. **Journal of obesity**, *2013*.

VENDRELL, J., MAYMÓ-MASIP, E., TINAHONES, F., GARCÍA-ESPAÑA, A., MEGIA, A., CAUBET, E., ... & CHACÓN, M. R. (2010). Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, *95*(6), 2983-2992.

VONA-DAVIS, L., & ROSE, D. P. (2013). The Obesity-Inflammation-Eicosanoid Axis in Breast Cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, *18*(3-4), 291-307.

WALKER, W., & ROTONDO, D. (2004). Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12-and interleukin-18-induced natural killer cell interferon- $\gamma$  synthesis. **Immunology**, 111(3), 298-305.

WAN, H. C. ; MELO, R.C.N. ; ZHOUNG, J. ; DVORAK, A. M. ; WELLER, P. F. . Roles and Origins of Leukocyte Lipid Bodies: Proteomic and Ultrastructural Studies (H.C. Wan and R.C.N. Melo contributed equally to this work).. The FASEB Journal , v. 21, p. 167-178, 2007.Wan, H. C., Melo, R. C., Jin, Z., Dvorak, A. M., & Weller, P. F. (2007). Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. **The FASEB Journal**, 21(1), 167-178.

WERNECK-BARROSO, E., MOURA, A. N., MONTEIRO, M. M., DE LIMA JÚNIOR, O. M., DE MEIRELLES, M. D. N. L., & HENRIQUES, M. D. G. M. O. (2000). Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. **Inflammation Research**, 49(5), 206-213.

WULSTER-RADCLIFFE, M. C., AJUWON, K. M., WANG, J., CHRISTIAN, J. A., & SPURLOCK, M. E. (2004). Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, 316(3), 924-929.

YANG, W. S., LEE, W. J., FUNAHASHI, T., TANAKA, S., MATSUZAWA, Y., CHAO, C. L., ... & CHUANG, L. M. (2001). Weight reduction increases plasma

levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 86(8), 3815-3819.

ZACHARY T. BLOOMGARDEN. 2003. Inflammation and Insulin Resistance. ***Diabetes Care*** May 2003 vol. 26 no. 5 1619-1623

ZHOU, Q., LEEMAN, S. E., & AMAR, S. (2011). Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108(7), 2867-2872.