



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

DANILO PIRES DE RESENDE

**Influência da inflamação crônica de baixo grau na susceptibilidade
à tuberculose e resposta vacinal em camundongos.**

**Goiânia
2019**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Danilo Pires de Resende

Título do trabalho: Influência da inflamação crônica de baixo grau na susceptibilidade à tuberculose e resposta vacinal em camundongos.

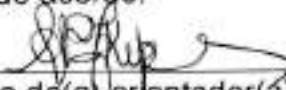
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Prof. Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis
orientadora de mestrado das Doenças Infecciosas
Instituto de Saúde e Saúde Pública

Data: 16 / 12 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

DANILO PIRES DE RESENDE

**Influência da inflamação crônica de baixo grau na susceptibilidade
à tuberculose e resposta vacinal em camundongos.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Tropical e
Saúde Pública da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do Título de Doutor em
Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula
Junqueira-Kipnis

Co-orientador: Prof. Dr. André Kipnis

**Goiânia
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pires de Resende, Danilo

Influência da inflamação crônica de baixo grau na susceptibilidade à
tuberculose e resposta vacinal em camundongos. [manuscrito] /
Danilo Pires de Resende. - 2019.

xv, 123 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ana Paula Junqueira-Kipnis; co-orientador Dr.
André Kipnis.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico,
tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Inflamação. 2. obesidade. 3. Metabolismo. 4. Vacinação. I.
Junqueira-Kipnis, Ana Paula, orient. II. Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n - Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmstp.ufg@gmail.com



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DANILO PIRES DE RESENDE - Aos quatorze dias do mês de outubro do ano de 2019 (14/10/2019), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ANA PAULA JUNQUEIRA-KIPNIS, HELIOSWILTON SALES DE CAMPOS, SIMONE GONÇALVES DA FONSECA, CRISTIANE COMINETTI e MARIA CLAUDIA DANTAS PORFÍRIO BORGES ANDRÉ para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"Estado microinflamatório crônico na obesidade grave e sua relação com susceptibilidade à tuberculose e resposta vacinal"** em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em: **IMUNOLOGIA**, de autoria de **DANILO PIRES DE RESENDE** discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1481/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovado ou Reprovado**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis

Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos

Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

Profa. Dra. Cristiane Cominetti

Profa. Dra. Maria Claudia Dantas Porfírio Borges André

Aprovado / Reprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Habilitado (Habilitado ou não Habilitado), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **IMUNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17h55min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, Heloísa de Sousa Vieira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Influência da inflamação crônica de baixo grau na susceptibilidade à tuberculose e resposta vacinal em camundongos.

Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis (IPTSP/UFG):

Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos (IPTSP/UFG):

Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca (IPTSP/UFG):

Profa. Dra. Cristiane Cominetti (FANUT/UFG):

Profa. Dra. Maria Claudia Dantas Porfírio Borges André (IPTSP/UFG):

Secretária da Pós-Graduação:

Daniло Pires

Simone G. Fonseca

Cristiane Cominetti

Maria Claudia

Heloísa de Sousa Vieira

À CIÊNCIA BRASILEIRA

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

Aos meus pais, Sérgio Jeová e Odalice, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam O MELHOR de todos, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar não ser O MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigado pelo amor incondicional!

Aos meus irmãos, Guilherme e Marília, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Obrigado pela confiança!

À professora Ana e ao professor André, que acreditaram em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponíveis e dispostos a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo do doutorado para absorver algum tipo de conhecimento. Fizeram-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma tese, mas vidas humanas. Você, professora Ana, não foi somente uma orientadora, mas em alguns momentos, conselheira e amiga, sempre puxando minha orelha quando fosse preciso. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigado por estarem ao meu lado e acreditarem tanto em mim!

Aos meus amigos do laboratório, pelos momentos divididos juntos, Monalisa, Lázaro, Nayra, Fábio, Rogerio, Larissa, Neila, Victor, Camila, Elias e especialmente para a Adeliane, sem quem nada desse trabalho seria possível. Vocês se tornaram verdadeiros amigos e tornaram meu trabalho mais leve. Obrigado por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro. À professora Erika Aparecida e sua equipe, aos funcionários do biotério do IPTSP, Obrigado a todos pelo apoio!

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha tese de doutorado. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma lição de vida.

OBRIGADO A TODOS!

SUMÁRIO

QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	v
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
PRÓLOGO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Obesidade.....	16
1.2. Diabetes Mellitus	23
1.3. Tuberculose	27
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
5. RESULTADOS	35
1.5. Artigo 1.	36
1.6. Artigo 2.	78
6. DISCUSSÃO GERAL	101
7. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS	122
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	121
Anexo 2 – Comprovantes de submissão dos artigos/ aceite para publicação para artigos ainda não publicados/ DOI dos artigos publicados.....	122

QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1	Porcentagem da população adulta definida como obesA em 2016.	17
Figura 2	Exemplo de molécula de triacilglicerol	18
Figura 3	Distribuição demográfica mundial de indivíduos diabéticos.	24
ARTIGO 1		
Tabela 1	Severe obese, Active TB and healthy patient demographic data	67
Figura 1	Median fluorescence intensity (MFI) of CD86 and CD206 molecule expression by CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ , CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ and CD14 ⁺ CD16 ⁺ monocytes isolated from PBMCs of OB and OBDM patients	70
Figura 2	Gating strategy for circulating monocyte analysis and monocyte sub-population percentage from healthy control, OB, OBDM and active TB patients	71
Figura 3	CD86 and CD206 expression by classical, intermediate and non-classical monocytes from healthy control, OB, OBDM and active TB patients	72
Figura 4	Median fluorescence intensity (MFI) of IL-12p40/23 and IL-6 cytokines in CD14 ⁺ CD16 ⁺ monocytes from PBMCs, and serum cytokines from OB and active TB patients	73
Figura 5	Median fluorescence intensity (MFI) of TLR-2 and TLR-4 of CD14 ⁺ CD11b ⁺ monocyte populations	74
Figura 6	Mtb (H37Rv) infection of monocytes from healthy controls, OB, OBDM and active TB patients	75
Figura 7	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> infection of monocytes from healthy controls, OB, OBDM and active TB patients	76
ARTIGO 2		
Figura 1	Ganho de peso e aumento de glicose sanguínea pós dieta hipercalórica de 12 semanas	83

Figura 2	Células TCD4 e TCD8 específicas produtoras de IFN γ no baço dos animais infectados	84
Figura 3	Porcentagem de área lesionada no pulmão dos animais	85
Figura 4	Análise histopatológica do pulmão de camundongos C57BL/6 SOB dieta hiperlipídica após infecção com Mtb	87
Figura 5	Recrutamento de células inatas para pulmão de animais C57BL/6 sob dieta hiperlipídica ou não após infecção por Mtb	88
Figura 6	Amplitude do recrutamento de células inatas para o pulmão dos animais C57BL/6 sob dieta hiperlipídica ou não após infecção por Mtb	90
ANEXOS		
Anexo 1	Aprovação do comitê de ética em pesquisa	121
Anexo 2	Comprovante de aceite do artigo	123

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

2-MAG	2-monoacilglicerol
ACAT	acil-CoA colesterol aciltransferase
ADD-1	fator de diferenciação e determinação de adipócitos -1; do inglês Adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1
AGE	Produtos finais de glicação avançada, do inglês, Advanced Glycation End-products.
AKT	Proteína quinase B
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
CCR2	Receptor de quimiocina C-C 2
CDC	Centro de controle de doenças; do inglês Centers for Disease Control
ChREBP	Proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos
CRP	Proteína C reativa
DAG	Diacilglicerol
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade; do inglês High-density lipoprotein
HIV	Vírus da imunodeficiência humana; do inglês human immunodeficiency vírus
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IKKβ	Subunidade β do inibidor de NF- κ B
IMC	Índice de Massa Corporal
IRF	Fator regulador de interferon
IRS	Substrato do receptor de insulina, do inglês, insulin receptor substrate
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mTORC1	Alvo mamífero do complexo da rapamicina 1
NF-κB	Fator nuclear Kappa B; do inglês Nuclear factor Kappa B
NK	Natural Killer
NLRP3	Proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD

NO	Óxido nítrico
NOD2	Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo 2
OBDM	Obesidade e diabetes
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio 1
PI3K	Fosfoinositol 3' quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5) -trifosfato
PKC	Proteína quinase C
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões; do inglês Pattern recognition receptors
PTPs	Tirosina fosfatases; do inglês protein tyrosine phosphatase
RAGE	Receptores de AGE
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SREBP-1c	Proteína ligadora de elemento regulador de esterol-1c; do inglês Sterol regulatory element-binding protein 1c
TAG	Triacilglicerol
TB	Tuberculose
TLR	Receptor semelhante ao Toll; do inglês Toll-like receptor
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade; do inglês very low-density lipoprotein

RESUMO

Influência da inflamação crônica de baixo grau na susceptibilidade à tuberculose e resposta vacinal em camundongos.

Condições crônicas associadas à inflamação, como obesidade (OB), diabetes *mellitus* (DM) e tuberculose (TB), são problemas sérios de saúde pública. A epidemia de OB está aumentando em todo o mundo; e a prevalência de OB entre adultos quase dobrou em entre 1980 e 2017. Como o DM está associado à OB, a prevalência de diabetes também aumentou no mesmo período, chegando a 9% da população adulta em todo o mundo, totalizando 422 milhões de pessoas. Estudos vem demonstrando o DM como fator de risco para o desenvolvimento de tuberculose, levantando a hipótese da existência de associação entre OB, DM e a TB. Já foi mostrado que as proporções de subpopulações de monócitos circulantes se alteram durante a OB, DM e a TB, no entanto, nenhum trabalho avaliou as subpopulações de monócitos na OB grave/DM e se existirem características que podem estar associada à maior susceptibilidade à TB. Na primeira parte deste trabalho demonstramos, em um estudo de corte transversal, com indivíduos com OB grave (IMC acima de 35kg/m²) portadores (OBDM) ou não (OB) de DM (n=50 indivíduos por grupo) que a população não-clássica de monócitos de indivíduos OBDM apresenta características similares às dos monócitos dos indivíduos com TB pulmonar ativa, e que monócitos de indivíduos OBDM e com TB são mais susceptíveis à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), o que sugere que a semelhança fenotípica e a susceptibilidade dos monócitos possam ser fatores que contribuem para a associação entre tuberculose e obesidade. Uma vez que os monócitos/macrófagos se alteram na obesidade e essas mudanças interferem na habilidade de controlar Mtb, decidimos avaliar se o desenvolvimento de obesidade poderia alterar a capacidade de resgatar a resposta imune específica após a vacinação com *M. bovis* BCG. Logo, na segunda parte deste trabalho, avaliamos se a obesidade interfere na resposta à vacina BCG, vacinando camundongos C57BL/6 jovens e induzindo a obesidade por dieta hipercalórica e analisando a resposta imune após o desafio com Mtb. A obesidade induzida após a vacinação com BCG não interferiu no resgate de linfócitos TCD4⁺IFN γ ⁺ após o desafio com Mtb. No entanto, essa resposta ao Mtb foi reduzida. Estes resultados sugerem que a vacinação de animais

não obesos induz respostas imunes vacinais que não se alteram com as modificações metabólicas induzidas pela obesidade.

Palavras-chaves: Diabetes, Metabolismo, BCG, Obesidade

ABSTRACT

Influence of low grade chronic inflammation on susceptibility to tuberculosis and vaccine response in mice.

Chronic conditions associated with inflammation, such as obesity (OB), diabetes mellitus (DM) and tuberculosis (TB), are serious public health problems. The OB epidemic is increasing worldwide; and the prevalence of adult obesity nearly doubled between 1980 and 2017. Since DM is associated with diabetes, the prevalence of diabetes also increased over the same period, reaching 9% of the adult population worldwide, totaling 422 million people. Studies have been demonstrating DM as a risk factor for the development of tuberculosis, raising the hypothesis of an association between OB, DM and TB. Circulating monocyte subpopulation proportions have been shown to change during OB, DM, and TB, however no studies have evaluated monocyte subpopulations in severe OB / DM and if there are characteristics that may be associated with increased susceptibility to TB. In the first part of this study we demonstrated, in a cross-sectional study, with individuals with severe OB (BMI over 35kg / m²) with or without OB (DM) (n = 50 individuals per group) that the population did not of monocytes from OBDM individuals presents similar characteristics to monocytes from individuals with active pulmonary TB, and monocytes from OBDM and TB individuals are more susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection. This suggests that phenotypic similarity and susceptibility of monocytes may be factors contributing to the association between tuberculosis and obesity. Since monocytes/macrophages change in obesity and these changes interfere with the ability to control Mtb, we decided to assess whether the development of obesity could alter the ability to rescue the specific immune response following *M. bovis* BCG vaccination. Thus, in the second part of this paper, we evaluated whether obesity interferes with BCG vaccine response by vaccinating young C57BL / 6 mice and inducing obesity by hypercaloric diet and by analyzing the immune response after Mtb challenge. Obesity induced after BCG vaccination did not interfere with TCD4 + IFN γ + lymphocyte rescue after Mtb challenge. However, this response to Mtb has been reduced. These results suggest that vaccination of non-obese animals induces vaccine immune responses that do not change with obesity induced metabolic changes.

Keywords: Diabetes, Metabolism, BCG, Obesity

PRÓLOGO

Meu nome é Danilo Pires de Resende, sou graduado em Biomedicina pela Universidade Federal de Goiás (UFG-2012/1). Durante a graduação, em meados de 2011, fui parte do programa de iniciação científica (PIBIC) no Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sob a supervisão da professora Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis, com a qual fui iniciado nas atividades de pesquisa científica. Neste período, tive a oportunidade de participar da avaliação de uma nova vacina desenvolvida pelo grupo de pesquisa da professora Ana Paula, a vacina recombinante MC2-CMX e, com grande ajuda de todos os membros da equipe, desenvolvi meu trabalho de conclusão de curso intitulado “Avaliação da imunogenicidade de uma vacina *M. smegmatis* recombinante expressando proteínas fusionadas de *M. tuberculosis*”. Também neste ano tive a oportunidade de contribuir para a publicação de um artigo científico pelo grupo intitulado “Prime-Boost with *Mycobacterium smegmatis* Recombinant Vaccine Improves Protection in Mice Infected with *Mycobacterium tuberculosis*” (Plos One), que se tornou o primeiro artigo no qual participei. Ao concluir a graduação (2012/1) retornei ao laboratório e tive a oportunidade de realizar o processo seletivo para o Mestrado (2013).

Durante o mestrado o laboratório estava finalizando a construção de uma vacina BCG recombinante expressando a proteína CMX (rBCG-CMX). A rCMX é uma proteína de fusão construída por nosso grupo, composta por epítomos imunodominantes dos antígenos Ag85c, MPT51 e HspX inteiro de *Mtb*. Esta vacina ativou a resposta imune em camundongos além de ser antigênica em indivíduos com TB ativa (de Sousa et al., 2012). Com o intuito de utilizar a rCMX em um modelo vivo de crescimento rápido, a proteína foi expressa por vetor *Mycobacterium smegmatis* (mc2-CMX), por meio da qual mostrou ser boa indutora de resposta imune do tipo Th1 e Th17 em pulmão de camundongos imunizados, sendo também boa indutora de anticorpos IgG1 e IgG2a (Junqueira-Kipnis et al, 2013). Diante do contexto de que a rCMX favorece uma resposta eficaz contra a TB, a proteína foi, então, expressa no vetor vivo BCG (rBCG-CMX). Desta maneira, ingressei no grupo responsável por realizar a avaliação da resposta imune e proteção induzida por esta vacina, juntamente com a então doutoranda Adeliene Castro da Costa e com o mestrando Abadio da Costa Junior. No mestrado, avaliei o recrutamento de células inatas induzido pela vacina BCG-CMX em camundongos deficientes das citocinas IL-17 e IL-22, citocinas pertencentes à resposta do tipo Th17, vista anteriormente ser o

diferencial na melhor resposta da vacina BCG-CMX. Neste período tive a oportunidade de participar em mais uma publicação de artigo científico pelo grupo de pesquisa intitulado “A New Recombinant BCG Vaccine Induces Specific Th17 and Th1 Effector Cells with Higher Protective Efficacy against Tuberculosis” (Plos One).

Após finalizarmos o meu mestrado, decidi em conjunto com a Profa. Ana Paula, realizar a prova de seleção para o doutorado no meio do ano vigente (2015). Infelizmente, em tal período ocorreu a greve dos funcionários técnicos administrativos da UFG, resultando no não lançamento do edital de seleção de doutorado para essa época. Deste modo, decidimos realizar a seleção no início do ano seguinte. No entanto, durante o ano de 2015, mesmo não estando matriculado e sem receber bolsa, continuei minhas atividades no laboratório como colaborador, neste período foram realizadas as coletas.

No início de 2016, começamos as atividades do doutorado. Fizemos uma parceria com a faculdade de Medicina, na pessoa da Profa. Dra. Erika Aparecida da Silveira, que durante todo esse período foi de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho, e nos propomos a avaliar a resposta imune de pacientes obesos e a relação desta doença com a tuberculose. Nos primeiros anos do doutorado, avaliamos os leucócitos circulantes de pacientes obesos recrutados pela equipe da professora Erika e com os dados resultantes publicamos meu primeiro artigo como primeiro autor intitulado “Non-classical circulating monocytes in severe obesity and obesity with uncontrolled diabetes: A comparison with tuberculosis and healthy individuals” (Tuberculosis), cujos detalhes serão tratados nessa tese. Em seguida, avaliamos o papel da obesidade e do diabetes na formação de resposta vacinal pela vacina BCG, utilizando camundongos obesos induzidos por dieta, no intuito de avaliar se a crescente epidemia de obesidade infantil pode afetar o controle da tuberculose pela vacinação. Os detalhes dessa pesquisa serão tratados no segundo capítulo desta tese. Durante o doutorado também tive a oportunidade de participar da publicação de mais dois artigos científicos junto com o grupo de pesquisa do laboratório, intitulados “Modulation of Macrophage Responses by CMX, a Fusion Protein Composed of Ag85c, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis*” (Frontiers in Microbiology) e “Antimicrobial and Chemotactic Activity of Scorpion-Derived Peptide, ToAP2, against *Mycobacterium massiliensis*” (Toxins).

Após 8 anos de trabalho com pesquisa (2011-2019) tive a oportunidade de participar de 5 artigos publicados. Além de podermos contar como produto mais de 18

resumos apresentados em congressos nacionais e internacionais. Tal produção científica só foi alcançada graças à grande ajuda de todos os membros da equipe da Profa. Ana Paula e do Prof. André Kipnis, especialmente à Profa. Dra. Adeliane Castro da Costa, e à orientação e cuidado da Profa. Ana Paula à quem sou eternamente grato.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade

A obesidade é uma doença neurocomportamental, crônica, multifatorial em que o aumento da gordura corporal promove disfunções do tecido adiposo resultando em consequências adversas de bases metabólica, bioquímica e psicossocial para a saúde. É diagnosticada pelo Índice de Massa Corporal (IMC), que é o peso (em quilogramas) do indivíduo dividido pelo quadrado da sua estatura (em metros). Pessoas com IMC entre 25-29,9 kg/m² são consideradas com sobrepeso e pessoas com IMC igual ou superior a 30 kg/m² são consideradas obesas (WHO, 2018). No entanto, a Organização Mundial de Saúde preconiza que medidas adicionais, como circunferência abdominal, razão entre cintura e quadril e entre cintura e estatura são superiores ao IMC isoladamente, para o enquadramento do indivíduo com obeso (WHO, 2018).

No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a prevalência de obesidade na população com 20 anos de idade ou mais é de 12,5% entre homens e de 17,0% entre mulheres (IBGE, 2010). Os dados mais recentes disponíveis sobre a prevalência de obesidade grave (IMC ≥ 40 kg/m²) apontaram um aumento de 255% entre a pesquisa nacional realizada em 1974-1975 (0,18%) e a pesquisa de 2002-2003 (0,64%). Dados da prevalência de obesidade grave nos Estados Unidos entre os anos de 2001 e 2005 demonstram que para as faixas de IMC ≥ 40 kg/m² e de IMC ≥ 50 kg/m² o aumento foi 2 e 3 vezes maior, respectivamente, do que para IMC ≥ 30 kg/m² (SANTOS et al., 2008; STURM, 2007). Isso é preocupante, pois à medida que o grau da obesidade aumenta, os riscos à saúde também se intensificam, sendo claramente mais pronunciados em indivíduos que apresentam obesidade grave (BESSESEN, 2008; WYATT; WINTERS; DUBBERT, 2006).

A obesidade apresenta importância no cenário mundial (Figura 1) com impactos negativos como aumento da mortalidade e redução da qualidade de vida devido às diversas alterações metabólicas e comorbidades associadas, questões psicológicas e sociais, como discriminação de indivíduos e altos gastos gerados para a saúde pública. Apesar disso, pesquisas com obesos graves (IMC ≥ 35 kg/m²) são menos exploradas, sendo encontradas com mais frequência pesquisas em indivíduos com sobrepeso (IMC $\geq$

25 kg/m²) ou com enfoque em técnicas e efetividade de cirurgias bariátricas (FERNSTRÖM et al., 2015).

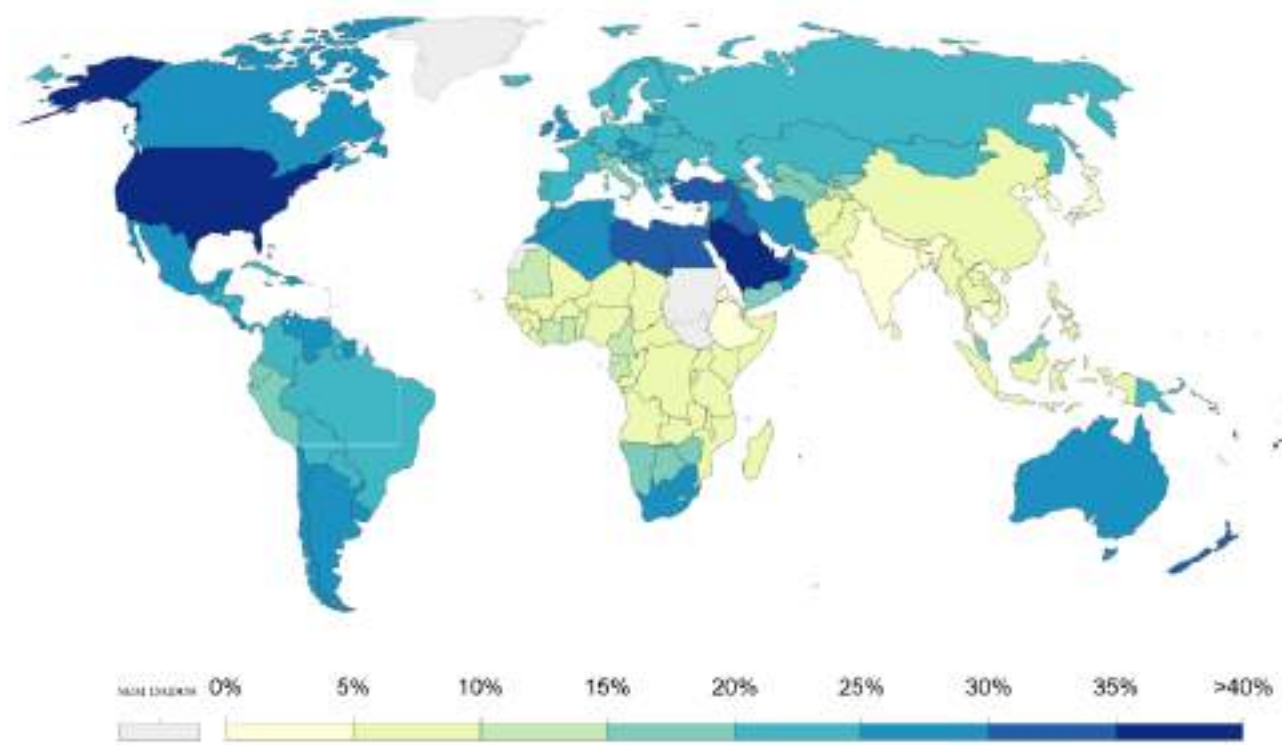


Figura 1. Porcentagem da população adulta definida como obesa em 2016. Porcentagem de adultos com mais de 18 anos de idade definidos como obesos baseado no índice de massa corporal (IMC) no mundo. Adaptado de World Health Organization Global Health Observatory.

Por se tratar de doença de caráter multifatorial com interações entre genética, meio ambiente e comportamento, as causas da obesidade são difíceis de serem estabelecidas. Múltiplos fatores endógenos e ambientais podem levar à obesidade (FLIER, 2004). No entanto, na maioria dos casos, a combinação de consumo excessivo de calorias e a redução na atividade física são tidas como as principais contribuições para a obesidade (WISSE; KIM; SCHWARTZ, 2007). Assim, o resultado de um desequilíbrio entre o consumo e o gasto de energia leva ao acúmulo de tecido adiposo cujos mecanismos serão explicados adiante (KEITH et al., 2006; WYATT; WINTERS; DUBBERT, 2006).

De forma geral, o consumo calórico excessivo resulta em aumento do acúmulo de lipídios nos adipócitos (hipertrofia) e aumento em seu número (hiperplasia). Os

adipócitos hipertrofiados secretam agentes pró-inflamatórios, como Fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1) em maior quantidade, promovendo uma inflamação sistêmica de baixo grau (KENNEDY et al., 2008). O metabolismo do tecido adiposo é altamente regulado por hormônios, como insulina, leptina, adiponectina; além de outros fatores como a alimentação e o exercício físico. A integridade do processo de regulação do metabolismo do tecido adiposo é essencial para a manutenção da homeostase do peso corporal e a desregulação desse processo provavelmente tem papel importante na obesidade, resistência insulínica e diabetes mellitus tipo 2 (LARGE et al., 2004).

O consumo diário médio de gordura na dieta ocidental varia dentre 50 a 100g, que proveem entre 35 a 40% da energia diária. A gordura consumida consiste principalmente de triacilgliceróis (TAGs), que são o principal componente de gorduras e óleos, além de fosfolipídios, e colesterol. A digestão de gordura envolve mecanismos de emulsificação no estômago, lipólise pela ação de enzimas lipases, e solubilização com sais biliares no duodeno, finalmente culminando na absorção pelas células epiteliais ou enterócitos, que compõem o lúmen do intestino delgado (IQBAL; HUSSAIN, 2009).

TAG, um glicerol tri-éster, é a principal forma de armazenamento de energia em forma de lipídios e o principal componente do tecido adiposo (Figura 2), compondo cerca de 80% do peso seco desse tecido, sendo os ácidos graxos palmitato, estearato, oleato e linoleato os principais componentes. Ácidos graxos que são destinados à oxidação também são componentes de TAG em menor proporção e estão presentes nos tecidos capazes de oxidar ácidos graxos de cadeia longa, como músculos, coração e tecido adiposo. TAGs são sintetizados pelos intestinos e fígado, onde são unidos às lipoproteínas para transporte até os demais tecidos onde serão oxidados ou armazenados (GRIFFIN, 2013).

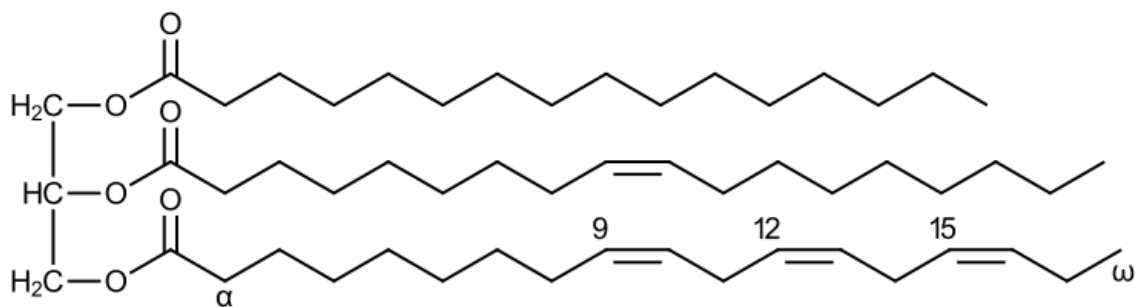


Figura 2. Exemplo de molécula de triacilglicerol (TAG). Molécula de Triacilglicerol insaturado com radicais carboxílicos diferentes. Porção à esquerda: glicerol. Porção à

direita (de cima para baixo): ácido palmítico, ácido oleico, ácido alfa-linolênico. Fórmula: $C_{55}H_{98}O_6$.

A lipólise é o processo de quebra, catalisada por enzimas, de lipídios complexos, resultando na liberação de ácidos graxos livres dos TAGs, assim como fosfolipídios e ésteres de colesterol (FRÜHBECK et al., 2014). Ela envolve a ruptura da ligação entre os ácidos graxos e a molécula de glicerol do TAG, e ocorre tanto no trato digestivo quanto na circulação e dentro das células. A lipólise no duodeno é feita pela enzima lipase pancreática, uma enzima extracelular que atua principalmente na gordura advinda da dieta, em contraste com demais enzimas, como fosfolipase e colesterol hidrolase que atuam em fosfolipídios e colesterol respectivamente. A lipase pancreática hidrolisa ácidos graxos de forma sequencial com a remoção inicial da cadeia de ácido graxo da posição 1 da molécula de glicerol, seguido pela posição 3, gerando uma molécula de 2-monoacilglicerol (2-MAG) (FRÜHBECK et al., 2014).

As gorduras são solubilizadas no duodeno pela ação dos sais biliares primários, que são produzidos a partir do colesterol no fígado pela ação da enzima 7- α -hidroxilase. Esses sais biliares agem como detergente, solubilizando os lipídios para a formação de micelas, que são associações esféricas de moléculas anfipáticas que encapsulam um centro hidrofílico de ácidos graxos de cadeia longa, além de vitaminas (tocoferóis e carotenoides) (GRIFFIN, 2013). A absorção de ácidos graxos presentes nas micelas ocorre por difusão facilitada, com a ajuda de proteínas ligadoras de ácido graxo presentes na membrana do enterócito. Dentro do enterócito os ácidos graxos de cadeia longa são rapidamente reesterificados, juntamente com 2-MAG, em TAG pela ação da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT), para então serem associados com lipoproteínas no complexo de Golgi, formando a estrutura de transporte chamada quilomícron. Ácidos graxos de cadeia média e curta (<12 carbonos) são absorvidos diretamente na circulação portal e transportados para o fígado em associação com a albumina para a oxidação (MANSBACH; SIDDIQI, 2010).

Apesar de a maioria dos lipídios armazenados no tecido adiposo serem de origem da dieta, esse tecido é perfeitamente capaz de sintetizar ácidos graxos a partir de substratos em excesso (glicose) pela via da lipogênese *de novo*; esses ácidos graxos serão eventualmente transportados na forma de *very low-density lipoprotein* – lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) para os demais tecidos para utilização ou armazenamento (SANDERS; GRIFFIN, 2016). As duas principais enzimas envolvidas na síntese *de novo*, ácido graxo sintase e acil-CoA carboxilase, são abundantemente expressas no tecido

adiposo sob o controle do fator de transcrição proteína ligadora de elemento regulador de esterol-1c (SREBP-1c) (XU et al., 2013). Em indivíduos não obesos, a alimentação ativa a síntese de SREBP-1c de forma dependente de insulina (via mTORC1) ou de forma independente de insulina (via ChREBP) (HAAS et al., 2012).

O tecido adiposo é dividido em dois tipos: o tecido adiposo marrom, que é utilizado para geração de calor, e o tecido adiposo branco (chamado de amarelo em humanos), que é usado como armazenamento de energia (OTTAVIANI; MALAGOLI; FRANCESCHI, 2011). Ambos são compostos por adipócitos e por uma fração estroma-vascular de células, que consiste de leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e estromais e pré-adipócito (O'ROURKE, 2009).

O tecido adiposo também pode ser classificado, de acordo com sua localização no corpo, em tecido adiposo subcutâneo e visceral, essa classificação também diz respeito ao comportamento metabólico distinto desses dois tecidos. O tecido visceral é mais profundo e mais central no corpo, em proximidade aos órgãos internos incluindo o fígado. Os dois tipos de tecido adiposo respondem diferentemente aos estímulos neuroendócrinos e metabólicos, que podem acelerar ou retardar a acumulação de ácidos graxos (OTTAVIANI; MALAGOLI; FRANCESCHI, 2011).

Alguns dos mecanismos em potencial relacionados com a inflamação na obesidade, estão relacionados com a dieta rica em lipídios saturados que ativa as vias IKKb/NF-kB e JNK em adipócitos, hepatócitos e em macrófagos infiltrados nesses tecidos. Estímulos como TNF- α , IL-1, ligantes de TLR-4 e AGE (*advanced glycation end products*) têm sido mostrados capazes de ativar essas vias, além de estresse intracelular como produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), estresse do retículo endoplasmático, acúmulo de ceramidas e presença de proteína quinases (PKCs) (SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007). A indução de IKKb na obesidade leva à translocação de NF-kB para o núcleo, ativando a transcrição de citocinas pró-inflamatórias gerando um ciclo que contribui para a resistência à insulina (ISRAËL, 2010). Além disso, a ativação de JNK na obesidade promove a fosforilação de IRS-1 em resíduos de tirosina, o que prejudica a continuação da sinalização dos receptores de insulina (AGUIRRE et al., 2000).

Em maior detalhe, o aumento da adiposidade ativa as vias JNK e IKKb, de forma similar à ativação causada por estímulos inflamatórios clássicos como: citocinas e ligantes de TLRs. Desse modo, possíveis mecanismos de como a obesidade pode ativar a via JNK e translocação de NF-kB podem também envolver ou não a ação de receptores.

Por exemplo, JNK e IKKb são ativadas por receptores de reconhecimento de padrão como TLRs e os receptores de AGE (RAGE) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). TLRs são capazes de reconhecer conjugados lipídicos bacterianos, como TLR4 reconhece LPS, isso levanta a especulação de que lipídios endógenos ou moléculas associadas a lipídios endógenos podem ser reconhecidas por TLR em indivíduos obesos, o que foi verificado em estudo que demonstra a ligação de ácidos graxos saturados à TLR4 e sua ativação (LEE et al., 2001). Ademais, pacientes obesos apresentam uma elevada taxa de AGEs circulante (URIBARRI et al., 2015), o que pode levar à ativação de NF-Kb, após o reconhecimento pelo seu receptor da super família das imunoglobulinas, RAGE.

Para a via não dependente de receptores, o estresse celular também é capaz de ativar JNK e NF-kB, gerando EROs e estresse do retículo endoplasmático. O aumento da adiposidade leva ao aumento do estresse oxidativo pela instalação do estado de hipóxia no tecido hipertrofiado, gerando marcadores de estresse como EROs (LIN et al., 2005). O acúmulo de lipídios também ativa a resposta contra proteínas mal dobradas, o que acarreta em estresse do retículo endoplasmático tanto no tecido adiposo quanto no fígado (OZCAN et al., 2004). O estresse do retículo endoplasmático já foi demonstrado capaz de ativar JNK que leva à fosforilação de IRS-1 em resíduos de tirosina, desse modo dificultando a sinalização de insulina, além de promover a translocação de NF-kB (AGUIRRE et al., 2000). O acúmulo de ácidos graxos saturados também leva a síntese de ceramidas, que se acumulam nos tecidos e levam à ativação de JNK e IKKb (SUMMERS, 2006). Depois de iniciada, a inflamação gerada pelo estado obeso, é mantida pelo ciclo de produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1, MCP-1 e TNF- α (WANG; HE, 2018)

Muito do que se tem descoberto sobre a resposta imune na obesidade vem de estudos no tecido adiposo, apesar de ser claro que a inflamação ocorre sistemicamente. Depósitos adiposos normalmente contém múltiplas células imunes que juntas supervisionam a integridade e sensibilidade hormonal dos adipócitos. Em indivíduos eutróficos, essas células possuem no geral perfis reguladores, que controlam integridade e metabolismo do tecido através do controle das subpopulações de linfócitos T (WENSVEEN et al., 2015). Essas células produzem citocinas, como IL-10 e IL-4, que regulam outras células imunes, incluindo eosinófilos, mastócitos, dentre outras, que juntas mantêm os macrófagos residentes em um perfil de ativação M2 (LUMENG et al., 2007). Em troca, macrófagos M2 secretam IL-10 e outras citocinas que contribuem para a manutenção da sensibilidade à insulina dos adipócitos.

Macrófagos passam por mudanças dramáticas durante a obesidade, com aumento no seu número total no tecido adiposo, que em grande parte é devido ao recrutamento de macrófagos M1, que possuem um perfil pro-inflamatório e secretam citocinas como TNF- α . Este aumento do número de células, assim como o aumento da razão M1/M2 é um indicador de inflamação do tecido adiposo que acompanha a obesidade, e está associado com o desenvolvimento de resistência à insulina e alterações metabólicas (LUMENG et al., 2007). Macrófagos atuam como efetores de uma complexa reação desencadeada pela obesidade, geralmente caracterizada por uma resposta imune Th1. Tal resposta é normalmente desencadeada por uma infecção, no entanto, na obesidade essa reação imune inicia uma resposta crônica no tecido adiposo que envolve uma variedade de células, T, B, NK e outras que produzem citocinas para governar a acumulação e atividade de macrófagos M1 inflamatórios (LACKEY; OLEFSKY, 2016).

Esses fatos são corroborados devido aos pacientes obesos apresentarem níveis aumentados de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, ou proteína C reativa (FESTA et al., 2002; PARK; PARK; YU, 2005). Especificamente, a quantidade de gordura corporal, assim como circunferência abdominal, estão positivamente correlacionados com níveis séricos de mediadores pro-inflamatórias, como proteína C reativa (CRP), IL-6 fator C3 do complemento e proteína ligadora de retinol-4 (FESTA et al., 2002; PARK; PARK; YU, 2005), o que indica um grande impacto da obesidade central na inflamação. Esses dados corroboram com a já aceita hipótese de que a gordura abdominal visceral representa maior perigo para o organismo que a gordura subcutânea (SMITH; HASLAM, 2007).

Embora no tecido exista inflamação, as células do sangue periférico também apresentam alterações, por exemplo, indivíduos obesos podem demonstrar tanto aumento quanto diminuição do número de linfócitos totais no sangue periférico (O'ROURKE, 2009; TANAKA et al., 2001) e possuem uma diminuição nas populações de células T CD8⁺ juntamente com o aumento ou diminuição das populações de células T CD4⁺ (TANAKA et al., 2001). Indivíduos obesos também apresentam uma resposta proliferativa de linfócitos reduzida em resposta à estimulação com mitógenos, além de produção de citocinas desregulada (LAMAS; MARTINEZ; MARTI, 2002; TANAKA et al., 2001). Além disso, o número e atividade citotóxica de células NK é reduzida em indivíduos obesos (O'SHEA et al., 2010).

Devido às complicações decorrentes da obesidade, como diabetes e doenças cardiovasculares, geralmente levam anos para se estabelecer, modelos animais são de

grande importância para o estudo dos aspectos moleculares da obesidade e sua fisiopatologia. Um desses modelos que está ganhando grande atenção é o modelo de camundongo obeso induzido por dieta (WANG; LIAO, 2012).

Modelos experimentais são usados na tentativa de melhor compreender os elementos envolvidos na fisiopatologia da obesidade e suas complicações. De forma geral, podemos dividir os modelos experimentais de obesidade em genéticos e induzidos. Uma dieta hiperlipídica pode induzir obesidade e distúrbios metabólicos em roedores que lembram a síndrome metabólica humana, portanto o modelo de obesidade induzida por dieta é preferível em detrimento dos modelos com alterações genéticas (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007), também a resposta imune nesses animais, já está bem caracterizada (ZHANG et al., 2010).

Algumas linhagens de animais apresentam aumento no conteúdo de gordura corporal, enquanto outras linhagens se mostram resistentes ao ganho de peso (JOHNSON et al., 1991). Camundongos A/J e C57BL/KsJ são relativamente resistentes à dieta rica em gordura quando comparados com animais C57BL/6 (ROSSMEISL et al., 2003). Os camundongos C57BL/6 são um modelo particularmente eficiente em simular degenerações metabólicas humanas que são comumente observadas na obesidade; visto que, quando providos com dieta rica em gordura, esses animais desenvolvem obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão; e quando alimentados com ração tradicional balanceada, permanecem eutróficos e sem anormalidades metabólicas (COLLINS et al., 2004).

1.2. Diabetes *Mellitus*

Além de ser, por si só, um problema de saúde pública mundial, a obesidade é fator de risco para diversas doenças como: diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, apneia obstrutiva do sono, refluxo gastroesofágico, alterações musculo-esqueléticas e variados tipos de câncer (DIBAISE et al., 2008).

O diabetes *mellitus* 2 representa cerca de 90% a 95% de todos os casos dos diferentes tipos de diabetes. O diabetes tipo 2 pode ocorrer em crianças e adolescentes, mas, normalmente, inicia após os 30 anos e torna-se progressivamente mais comum com o avançar da idade. Aproximadamente 15% dos indivíduos com mais de 70 anos de idade

apresentam o diabetes tipo 2. A obesidade é um fator de risco do diabetes tipo 2; 80 a 90% dos indivíduos que o apresentam são obesos (AZEVEDO; GROSS, 1990).

As taxas de diabetes *mellitus* vêm aumentando no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, sendo estimado em 2014 um total aproximado de 387 milhões de pessoas com a doença, que equivale a 8,3% da população mundial, sendo que 77% das pessoas com diabetes *mellitus* vivem em países de baixa e média renda (Figura 3) (ZHENG; LEY; HU, 2018). Em 2014, foram reportadas 4,9 milhões de mortes causadas pela doença no mundo, estimando-se que a cada segundo uma pessoa morra por decorrência do diabetes, e projeções apontam que entre os anos de 2014 e 2035 haja um aumento de mais de 205 milhões de novos casos e que até lá se tornará a 7ª principal causa de morte no mundo. Ademais, 50% da população com diabetes *mellitus* desconhece que tem a doença, ficando sem o diagnóstico até que apareçam sinais de complicação (ZHENG; LEY; HU, 2018).

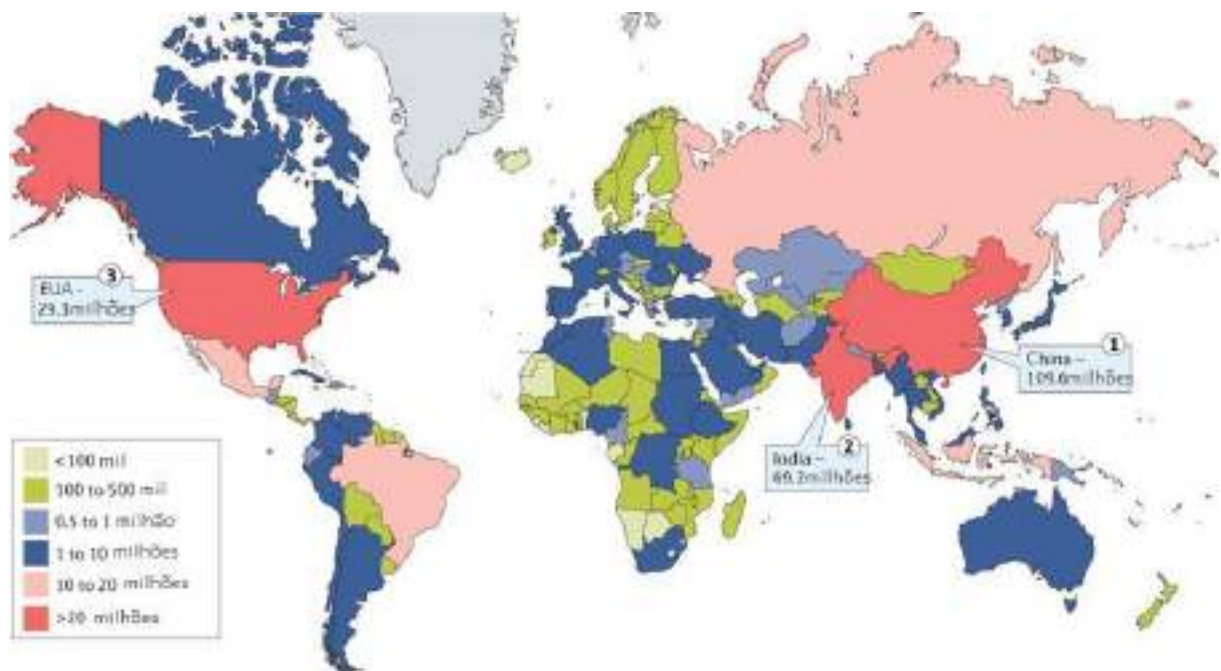


Figura 3. Distribuição demográfica mundial de indivíduos diabéticos. Número estimado total de adultos (20-79 anos de idade) vivendo com diabetes mellitus. Em destaque os três principais países em número de habitantes com diabetes em 2015. Adaptado de Zheng, Y. et al. (2018).

No Brasil, no final da década de 1980, estimou-se a prevalência de diabetes *mellitus* na população adulta em 7,6% (SARTORELLI; FRANCO, 2003). Na estimativa de 2014, o Brasil apresenta o maior quantitativo de pessoas com diabetes da região das

Américas Central e do Sul com 11,6 milhões de pessoas com diabetes, uma prevalência de 8,7% da população (ZHENG; LEY; HU, 2018).

O diabetes *mellitus* tipo 2 é uma síndrome heterogênea que é gerada por irregularidades na ação da insulina, sendo que a patogênese envolve fatores genéticos e ambientais (WHITE et al., 2003). O pâncreas continua a produzir insulina, algumas vezes em níveis mais elevados do que o normal. No entanto, o organismo desenvolve uma resistência aos seus efeitos e o resultado é um déficit relativo à insulina, ocasionando excesso de insulina e glicose no sangue e células com pouca glicose. O pâncreas acaba liberando uma elevada quantidade de insulina para compensar os altos níveis de glicose no sangue, o que leva as células β a se deteriorarem. Quando as células β são destruídas, não há a produção de insulina e o indivíduo passa a ter a necessidade de usar insulina sintética e medicamentos para aumentar a sensibilidade à insulina (WHITE et al., 2003).

Os efeitos metabólicos da insulina são mediados por vários eventos tecido-específicos que envolvem rápidas mudanças na fosforilação de proteínas, assim como mudanças na expressão de genes. O sinal inicial para a ação da insulina envolve a ativação do receptor de tirosina quinase, que resulta na fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) em diversos resíduos de tirosina. Essa fosforilação age como sítios de ligação para proteínas com domínio SH2, incluindo a subunidade reguladora p85 da fosfoinositol 3' quinase (PI3K). A ligação da subunidade catalítica da PI3K à p85 ativa a quinase lipídica que promove o transporte da glicose (ŚWIDERSKA et al., 2018).

A ação da insulina nos adipócitos também envolve mudanças na transcrição gênica. O fator de transcrição ADD-1/SREBP-1c (fator de diferenciação e determinação de adipócitos -1/ proteína ligadora de elemento regulador de esterol-1c) pode ter papel crucial na ação da insulina em regular a expressão gênica em adipócitos (GONDRET; FERRÉ; DUGAIL, 2001), por induzir genes envolvidos na lipogênese e reprimir genes envolvidos na oxidação dos ácidos graxos.

Os defeitos funcionais que levam à resistência à insulina podem ser devidos a sinalização prejudicada nos tecidos-alvo, ou seja, tecido adiposo, músculo esquelético e fígado. No tecido adiposo e nos músculos, há redução da ligação de insulina com seu receptor, redução da fosforilação dos receptores e redução na ação de tirosina quinase e fosforilação de Fatores de Regulação de Interferons (IRFs) (ALVIM et al., 2015). A sinalização defeituosa dos receptores de insulina é um importante componente da relação entre resistência à insulina e obesidade em humanos. Também existem alterações tecido-

específicas observadas em adipócitos humanos. A expressão de IRS-1 é reduzida, resultando em menor atividade de PI3K associada à IRS-1 (CHOI; KIM, 2010).

A maior síntese e secreção de adiponectina, TNF- α e IL-6, aumenta a lipólise por reduzir a atividade de perilipina, proteína que protege os lipídios da ação da lipase sensível a hormônios, está envolvidas na formação da resistência à insulina (AMRANI et al., 1996). Ademais, hipertrofia adiposa aumenta a infiltração tecidual de células imunes, fibrose e lipólise, e reduz a ativação de IRS-1 e a captação de glicose mediada por AKT, exacerbando a resistência à insulina e o surgimento de DM (GUSTAFSON et al., 2015). Portanto, adipocinas e hipertrofia adiposa causam resistência à insulina por bloquearem a inibição da lipólise pela via PI3K/AKT atenuando a capacidade de utilização de glicose, e por diminuir a capacidade de SREBP-1c de promover a síntese lipídica (HUANG et al., 2018).

Na obesidade, as alterações no tecido adiposo levam à diminuição da captação de ácidos graxos livres e da utilização de glicose, resultando em acumulação ectópica em outros tecidos. A acumulação ectópica de lipídios no fígado é altamente relacionada com a resistência à insulina e com a esteatose não alcoólica (TROUWBORST et al., 2018). Além disso, a oxidação excessiva de ácidos graxos livres aumenta a quantidade de acetil-CoA no fígado, o que ativa a enzima piruvato carboxilase, necessária para a gliconeogênese, e aumenta os níveis de DAG, que prejudica a via PI3K/AKT, desse modo aumentando a resistência à insulina (ŚWIDERSKA et al., 2018). A inflamação crônica, bem como o estresse do retículo endoplasmático, ambos presentes na obesidade, também prejudicam a sinalização de insulina via AKT, subsequentemente contribuindo para a resistência à insulina (CASTRO et al., 2013).

Tem sido sugerido que na obesidade há um aumento na expressão e atividade de diversas tirosinas fosfatases (PTPs) que desfosforilam e terminam a sinalização propagada pela fosforilação de resíduos de tirosina. Estudos mostram aumento na expressão e atividade de três PTPs, a PTP1B, LAR (fosfatase relacionada ao antígeno leucocitário), e PTPSCRC 2 (fosfatase scr-homologa-2) nos músculos e tecido adiposo de indivíduos obesos (ABDELSALAM et al., 2019; CHO, 2013; ZABOLOTNY et al., 2001). PTP1B e LAR foram demonstradas serem capazes de desfosforilar o receptor de insulina e IRS-1 *in vitro*. PTP1B tem além de seu papel regulador da ação da insulina, também tem papel na homeostase de energia (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014).

As alterações metabólicas que acarretam na resistência à insulina, em especial, o comprometimento da via PI3K/AKT, também levam a comprometimento da resposta imune, visto que essa via está relacionada com a ativação de diversas células. Por exemplo, em células dendríticas, a perda da função de PI3K reduz a internalização de TLR4 e a sua relocação para endossomos em resposta a estímulo de LPS, promovendo uma secreção precoce de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-12, além de reduzir a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (BHATTACHARYYA et al., 2004).

Neutrófilos de indivíduos diabéticos demonstram comprometimento de várias funções, incluindo migração para sítios inflamatórios, liberação de proteases líticas, fagocitose, produção de EROs e apoptose (HATANAKA et al., 2006). Ademais, estudos demonstram que neutrófilos de indivíduos diabéticos produzem altos níveis de TNF- α , IL-1 β , e IL-8 em ambos estados basais como após estimulação com LPS. Essa produção excessiva pode levar à dano tecidual, morte celular (HATANAKA et al., 2006) e aumento da susceptibilidade na invasão de microrganismos (GORNIK; GORNIK; GAŠPAROVIĆ, 2007). Adicionalmente, indivíduos com diabetes tem respostas imunes anormais, incluindo alterações na imunidade humoral e defeitos na função de neutrófilos e resposta de células T (HAMEED et al., 2015). Este fato pode ser associado às funções da PI3K que está envolvida na sinalização intracelular de IL-17 e na diferenciação de células Th17. Evidências tanto em humanos quanto em camundongos mostram que a perda da função de PI3K leva à má sinalização de IL-17, que pode gerar hiper-reatividade em neutrófilos e prejudicar a comunicação entre respostas imunes inata e adaptativa (KUREBAYASHI et al., 2012).

1.3. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Esta doença geralmente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas pode também afetar outros órgãos (TB extrapulmonar). É uma doença transmitida pelo ar quando pessoas doentes com a forma pulmonar expõem bactérias por meio da tosse, por exemplo. Em geral, uma proporção relativamente pequena de pessoas infectadas com o Mtb vai desenvolver a TB ativa, no entanto, a probabilidade de desenvolver a doença é muito maior entre pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A

TB também é mais frequente entre os homens do que mulheres, e afeta principalmente adultos na idade economicamente produtiva, sendo estimado que cerca de dois terços dos casos ocorrem em pessoas entre 15-59 anos (WHO, 2017). Apesar da disponibilidade de tratamentos altamente eficazes, a tuberculose continua a ser um grande problema de saúde global (WHO, 2017).

Por volta de 90% de pacientes TB são assintomáticos e podem ter a doença latente sem desenvolver a forma ativa. É estimado que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada por *Mtb*, com o risco de possível reativação que está altamente relacionado com insuficiência imune. O risco de evoluir para uma doença ativa é estimado em aproximadamente 5% durante o primeiro ano de infecção e mais 5% durante toda a vida (WHO, 2017).

Em 1993, a OMS declarou a TB uma emergência de saúde pública mundial, num momento em que foram estimados 7-8 milhões de casos e 1,3-1.6 milhões de mortes a cada ano. Em 2016, foi estimado de 10,5 milhões de casos e 1,3 milhões de mortes (incluindo mortes por tuberculose entre pessoas HIV-positivas), tornando a TB a doença infecciosa mais mortal do mundo (WHO, 2017).

O conhecimento sobre a dinâmica dessa doença tem como marco a identificação do bacilo *M. tuberculosis* por Robert Koch, em 1882. A TB é causada primariamente pelo *Mtb* (bacilo de Koch), entretanto em muitas partes do mundo uma quantidade significativa da doença é também devida à infecção por outras espécies de micobactérias que pertencem ao complexo *M. tuberculosis*, como *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. microti* e *M. pinnipedii* (COUSINS et al., 2003).

Mtb é o agente etiológico da tuberculose, pertencente à ordem dos *Actinomycetales*, subordem *Corynebacteriaceae*, família *Mycobacteriaceae*. É um bacilo aeróbio, não formador de esporos, sem flagelos, intracelular facultativo, medindo de 1 – 4 µm de comprimento por 0,3 – 0,6 µm de largura. Caracteriza-se por ser bacilo álcool-ácido resistente (BAAR).

No caso da TB, após a inalação de gotículas contaminadas, expelidas por um indivíduo infectado ao tossir, espirrar ou falar; o *Mtb* vai para os pulmões do novo hospedeiro. Ao atingir os alvéolos pulmonares, o *Mtb* é inicialmente reconhecido e fagocitado pelos macrófagos alveolares, residentes do tecido pulmonar. Na maioria dos casos, o macrófago alveolar, consegue destruir ou inibir a multiplicação dessas bactérias, e a infecção cessa ou se torna latente; o que evidencia o papel importante do sistema imune inato na proteção à TB. Após a fagocitose, o fagossomo contendo as bactérias será

fundido à um lisossomo presente no citoplasma da célula, dando origem à organela chamada fagolisossomo. Dentro do fagolisossomo, as bactérias são expostas ao pH ácido (4,5) dos lisossomos e às hidrolases, proteases, dentre outros mecanismos bactericidas presentes nessas organelas, o que resulta na destruição desses microrganismos (BURGDORF; KURTS, 2008).

As bactérias que escaparem da destruição inicial no fagolisossomo podem se multiplicar. Isso acarretará na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, atraindo monócitos e outras células inflamatórias para os pulmões. Os monócitos inflamatórios se diferenciam em macrófagos, que fagocitam as bactérias e dão início à formação do granuloma (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). Duas a três semanas após a infecção, células T específicas se desenvolvem, migram para os pulmões e produzem citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , que irá ativar os macrófagos para o controle da infecção (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2014).

O metabolismo do hospedeiro afeta as capacidades do sistema imune, isso é mais notado em indivíduos com extrema desregulação metabólica como, por exemplo, pacientes com DM. Pacientes DM tem o risco 3 vezes mais alto de evoluir para TB ativa (JEON; MURRAY, 2008). Hiperglicemia e insulinopenia celular podem afetar as funções tanto de macrófagos quanto de linfócitos, levando à uma menor capacidade de conter Mtb.

A patogenia da associação TB-DM parece ser multifatorial e não completamente entendida, mas a inflamação crônica parece ser a característica central da patogênese. Pacientes DM são mais vulneráveis à infecção e sofrem de doenças relativamente severas devido ao seu estado imunocomprometido. Existem mais chances de reativação de antigos focos de TB, em relação ao contato recente e, geralmente, exibem maior envolvimento dos lobos inferiores do que pacientes não diabéticos. Quando calculada a correlação entre parâmetros glicêmicos (glicose de jejum e HbA1c) e a produção de IFN- γ por células T de memória, pode-se observar uma correlação positiva entre hiperglicemia e aumento da produção de IFN- γ em resposta à estímulo por derivado proteico purificado (PPD) de Mtb em pacientes TB-DM (RESTREPO, 2016).

Monócitos de pacientes TB/DM parecem possuir fenótipo alterado que pode aumentar a susceptibilidade à TB, ou seja, uma maior expressão de CCR2 que pode prevenir a migração de monócitos para o sítio de infecção do Mtb (STEW et al., 2013). Consistentemente, uma resposta Th1 prejudicada e atrasada juntamente com a redução de expressão de óxido nítrico (NO) é evidente em camundongos com DM quimicamente

induzido e infectados com *Mtb*. Além disso, camundongos diabéticos infectados com *Mtb* mostraram possuir uma menor razão de citocinas Th1 para Th2 no sangue periférico (YAMASHIRO et al., 2005), sugerindo um pior prognóstico da infecção. Outro estudo sugere que a expansão seletiva de células T reguladoras no pulmão de pacientes TB/DM comparadas com as do sangue periférico, tem correlação com a redução dos níveis de IFN γ e aumento de IL-10 no sítio de infecção por *Mtb* (SUN et al., 2012).

É sugerido que tanto as respostas imunes adaptativa e inata podem ser afetadas em pacientes TB-DM. Uma disfunção na resposta celular inata em resposta ao patógeno altamente virulento juntamente com menor quantidade de linfócitos T e neutrófilos é notável em pacientes TB-DM. Além disso, uma relação TCD4/TCD8 alterada, inibição da função de macrófagos com comprometimento da produção de EROs tem efeito depreciativo direto na explosão respiratória em pacientes TB-DM (YORKE et al., 2017). Anormalidades na quimiotaxia, menor número de monócitos periféricos e com fagocitose comprometida, elevados níveis de citocinas tipo 1 e 17 circulantes também são demonstrados em pacientes TB-DM (PAL et al., 2016).

Células produtoras de citocinas Th1 tem um papel importante no controle e inibição do bacilo *Mtb*. Pacientes TB-DM exibem níveis elevados de citocinas Th1 (IFN γ , TNF- α , IL-2), Th17 (IL-17) e outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-18). Isso é associado com uma expansão de respostas Th1 e Th17 patógeno-específicas assim como um repertório aumentado de moléculas citotóxicas expressas por células TCD8 e células NK. A associação TB-DM também é correlacionada com frequências aumentadas de células de memória central TCD4 e TCD8 (RAPOSO-GARCÍA et al., 2017; RESTREPO, 2016). Uma melhora no controle da glicose em pacientes DM pode reverter os defeitos na função imune e reduzir a susceptibilidade à infecções (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012). Pacientes com o DM mal controlado, são caracterizados por diminuição dos níveis circulantes de adiponectina e/ou níveis aumentados de leptina, visfatina e inibidor de ativação de plasminogênio 1 (PAI-1) circulantes, indicando a presença de um *miliê* inflamatório pronunciado. Alterações em níveis sistêmicos de adipocinas indicam que inflamação no tecido adiposo alterado contribui para a patogênese de TB-DM (PAVAN KUMAR et al., 2016).

A inibição da sinalização de PI3K/AKT/mTORC1 também aumenta a produção de MMP1, uma collagenase crucial na patogênese de TB, além da expressão de múltiplas citocinas pro-inflamatórias (BRACE et al., 2017). Já foi mostrado que em pacientes com TB ativa, PI3K não é expressa no granuloma, além de macrófagos infectados com *Mtb*

terem expressão diminuída de PI3K (LEISCHING, 2018). Além do papel na formação da lesão pulmonar, estudos também sugerem que Mtb pode dificultar a sinalização PI3K/AKT/mTORC1 em linfócitos de modo a promover a diferenciação de células reguladoras, propiciando o escape da resposta imune; esse fenômeno é mostrado pela redução na ativação de componentes dessa via em linfócitos de pacientes com TB ativa (ZHANG et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma doença de difícil tratamento clínico e que acarreta importante perda de qualidade de vida, principalmente pelo surgimento de outras doenças associadas. Nas últimas duas décadas, as epidemias de OB e DM tem aumentado dramaticamente. Segundo a OMS, desde 1975 até 2017 o número de indivíduos obesos dobrou, resultando em aproximadamente 1,9 bilhões de adultos acima do peso, sendo destes 650 milhões obesos (WHO, 2018). Atualmente, é reconhecido que o tecido adiposo se comporta de maneira inflamatória, o que é, em parte, responsável pela disfunção metabólica e resistência à insulina que leva ao desenvolvimento de diabetes do tipo 2. A sobrecarga de nutrientes, e o subsequente aumento de massa adiposa, ocasiona hipóxia, estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático; o que em última estância resulta na disfunção dos adipócitos e indução de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6 e leptina (ELLULU et al., 2017).

A tuberculose, apesar de uma doença milenar, continua como um importante problema de saúde pública, sendo a doença infecciosa mais mortal do mundo. Uma característica que favorece a epidemia crescente de tuberculose é sua associação com outras doenças, sendo a mais conhecida a AIDS, o que culmina em formas mais severas da infecção. A epidemia de obesidade em países endêmicos para tuberculose levanta a preocupação de uma associação deletéria entre essas duas doenças, especialmente sendo a obesidade conhecida por agravar outras infecções do trato respiratório (ZAMMIT et al., 2010). Estudos iniciais mostraram uma relação inversa entre o índice de massa corporal e a incidência de tuberculose (LÖNNROTH et al., 2010b), sugerindo um efeito protetor da obesidade contra a infecção por Mtb; no entanto, a segunda principal doença associada à tuberculose é a diabetes do tipo 2, uma doença metabólica fortemente associada com a obesidade (AL-GOBLAN; AL-ALFI; KHAN, 2014).

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu metas para a erradicação da tuberculose até 2050 (WHO, 2014a). Logo, o entendimento da interação da TB com outras doenças é fundamental para o desenvolvimento de melhores tratamentos e métodos preventivos, especialmente a relação tuberculose-obesidade, cujo preciso mecanismo imunológico e/ou metabólico continua mal esclarecido. Tendo em vista que os monócitos são importantes células imunes para as três doenças em questão, na primeira parte deste trabalho nos propusemos a avaliar o possível envolvimento das subpopulações de

monócitos humanos na susceptibilidade de pacientes obesos e diabéticos à infecção por Mtb.

A principal forma de prevenção da TB é a vacinação com BCG, uma das vacinas mais bem-sucedidas, que oferece proteção contra as formas mais graves de tuberculose durante a infância e a recomendação da OMS é que seja utilizada até os dois meses de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No entanto, a vacina BCG não é suficiente para o controle da TB pulmonar, e nenhum trabalho avaliou se a obesidade poderia interferir na resposta imune para a vacina BCG, e a obesidade vem aumentando em crianças no mundo todo. Como já foi mostrado que a obesidade interfere na formação de respostas imunes protetoras para vacinas contra várias doenças, como influenza A (H1N1) (NEIDICH et al., 2017; SHERIDAN et al., 2012) e hepatite B (FAN et al., 2016b; LIU; GUO; DONG, 2017b), decidiu-se avaliar na segunda parte desse trabalho se a obesidade e diabetes induzida por dieta hipercalórica interferem no resgate da resposta vacinal para BCG em camundongos vacinados quando jovens.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento das subpopulações de monócitos na maior susceptibilidade à tuberculose em pacientes obesos e diabéticos, bem como avaliar a influência de dieta hiperlipídica no resgate da resposta imune por vacinação com BCG.

1.4. 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil das subpopulações de monócitos em pacientes OBDM;
- Comparar a indução e ativação de monócitos de pacientes OBDM com monócitos de pacientes TB;
- Avaliar a produção de citocinas por monócitos de pacientes OBDM e pacientes TB;
- Avaliar a expressão de TLRs em monócitos de pacientes OBDM e pacientes TB;
- Avaliar a capacidade microbicida de monócitos de pacientes OBDM e pacientes TB frente infecção *in vitro* com Mtb;
- Avaliar a indução de células TCD4⁺IFN γ ⁺ e TCD8⁺IFN γ ⁺ em camundongos obesos vacinados com BCG após infecção com Mtb;
- Avaliar a capacidade da vacinação com BCG em proteger o tecido pulmonar de lesão em animais obesos após infecção com Mtb;
- Avaliar o recrutamento de células inatas para o pulmão de camundongos obesos vacinados com BCG após infecção com Mtb;

5. RESULTADOS

Artigo 1 – Non-classical circulating monocytes in severe obesity and obesity with uncontrolled diabetes: a comparison with tuberculosis and healthy controls.

Danilo Pires de Resende^a, Adeliane Castro da Costa^a, Lorena Pereira de Souza Rosa^b, Ana Paula dos Santos Rodrigues^b, Annelise Silva e Alvez de Carvalho Santos^b, Camila Kellen de Souza Cardoso^b, Jaqueline Danesio de Sousa^c, André Kipnis^d, Erika Aparecida da Silveira^b and Ana Paula Junqueira-Kipnis^a.

Tuberculosis (Publicado)

Artigo 2 – Obesidade não interfere no resgate da resposta específica à vacinação com BCG em animais C57BL/6 desafiados com *Mycobacterium tuberculosis*.

Danilo Pires de Resende^a, Camila Oliveira Barbosa Moraes^a, Neila Teixeira Lima^a, Lilia Cristina de Souza Barbosa^a, Mara Rúbia Nunes Celes^c, André Kipnis^b, e Ana Paula Junqueira-Kipnis^a.

Revista (Submetido, Aceito, Publicado)

1.5. Artigo 1.

Title: Non-classical circulating monocytes in severe obesity and obesity with uncontrolled diabetes: a comparison with tuberculosis and healthy controls.

Running title: Similar monocyte profiles may contribute to Mtb infection.

Danilo Pires de Resende^a, Adeliane Castro da Costa^a, Lorena Pereira de Souza Rosa^b, Ana Paula dos Santos Rodrigues^b, Annelise Silva e Alvez de Carvalho Santos^b, Camila Kellen de Souza Cardoso^b, Jaqueline Danesio de Sousa^c, André Kipnis^d, Erika Aparecida da Silveira^b and Ana Paula Junqueira-Kipnis^a.

^a Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP 74605050.

^b Hospital das Clínicas- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina- UFG, Goiânia - GO, Brasil. Primeira avenida, setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP 75605020.

^c University of Northern Paraná, Paris Avenue, number 675, Reidencial Park João Piza, CEP 86041-120, Londrina, Paraná, Brazil.

^d Laboratório de Bacteriologia Molecular, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP 74605050.

Corresponding Author: Ana Paula Junqueira-Kipnis. Rua 235 esquina com Primeira Avenida, S/N. Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Setor Universitário, Goiânia- Goiás, Brazil. CEP 74605-050. Phone: +55 62 32096174; Fax: +55 62 32096363; E-mail: apkipnis@gmail.com.

Abstract word count: 200

Text word count: 7549

Abstract

Severe obesity and diabetes lead to a significant decrease in quality of life. Although controversial, population-wide studies have implicated obesity in the development of tuberculosis (TB). Non-classical monocytes have been described in obesity and TB, whereas in diabetes they have been associated with poorer clinical outcomes. The present study focuses on the functional significance of several monocyte populations of obese, obesity-related diabetic (OBDM), non-obese/diabetic tuberculosis and non-obese healthy control patients. Monocytes were evaluated by measuring expression of CD86, CD206, TLR-2 and TLR-4 as well as production of IL-6, IL-12, and by using a mycobacterial growth inhibition assay for both *Mycobacterium tuberculosis* and *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Non-classical monocytes from OBDM and non-obese TB patients exhibited similar activation profiles (CD86/CD206/TLR-2 and TLR-4 expressions). Only monocytes from TB patients had a higher positivity for IL-12 and IL-6, whereas adiponectin serum levels increased similarly between TB and OBDM patients. Monocytes from active TB patients and OBDM were more permissive to Mtb growth than obese individuals, but this susceptibility was not observed for *M. abscessus* subsp. *massiliense*. From these findings, we conclude that diabetes and tuberculosis had similarities in the population of circulating non-classical monocytes, improving our understanding of the association of these diseases.

Keywords: metabolism, co-infection, risk groups, severe obesity.

1. Introduction

Chronic conditions that are associated with inflammation, such as obesity (OB), diabetes mellitus (DM) and tuberculosis (TB) are serious public health problems. The Obesity epidemic is increasing around the world; between 1980 and 2014, the prevalence of obesity among adults, aged 18 and older, nearly doubled. In 2014, 39% of adults were overweight and 11% were classified as obese, totalizing more than 500 million people with obesity (WHO, 2014b). As diabetes is associated with obesity, the prevalence of diabetes had also increased in the same period, rising to 9% of the adult population worldwide, totalizing 422 million people with diabetes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

Obesity is characterized by secretion by the adipose tissue of inflammatory mediators like IL-1, IL-6, leptin, TNF- α and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) among others (ELLULU et al., 2017; KANDA et al., 2006). Diabetes patients as well present elevated circulating levels of acute phase proteins and inflammatory cytokines such as IL-1 and IL-6 (AHMAD et al., 2016; PRADHAN, 2001), as well as NLRP3 activation (MASTERS et al., 2010). Thus, obesity and diabetes are classified as chronic inflammatory diseases (ELLULU et al., 2017).

Monocytes are mononuclear phagocytes generated in the bone marrow (SANCHEZ et al., 2009) and are constantly liberated into the circulation, forming a heterogeneous population of cells. In humans, these cells can be divided into three subpopulations accordingly to the expression of the surface markers CD14 and CD16 into, classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺) and non-classical (CD14⁺CD16⁺) monocytes (DEVÊVRE et al., 2015). The proportions of these subpopulations have been shown to shift during several inflammatory illnesses like diabetes, obesity and tuberculosis. In obesity, for instance, it has been shown that the circulating non-classic monocytes are increased and could give rise to the inflammatory macrophages resident in the adipose tissue (PECHT et al., 2016) while circulating classical monocyte population appears to correlate with CD11c⁺ macrophages in the adipose tissue (WOUTERS et al., 2017). In diabetes, the variation in the populations of circulating monocytes is also present and some studies show that this variation is correlated with disease severity [12,13,14]. In tuberculosis, the non-classical and intermediate monocyte populations are expanded (CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011)

and were related to the severity of the infection and modulated by the treatment (SÁNCHEZ et al., 2006).

Within the monocyte subsets, the non-classical monocytes were described to increase in obesity (MATTOS et al., 2016), diabetes (PECHT et al., 2016) and tuberculosis (SAMPATH et al., 2018). Obese patients were shown to present a more inflammatory population of non-classical monocytes than lean controls, with greater production of inflammatory mediators (DEVÊVRE et al., 2015). The non-classical monocyte population is also increased in diabetes (YANG et al., 2012), and is related with complications caused by the disease (MIN et al., 2012). This monocyte subset is also increased in tuberculosis (CASTAÑO; GARCÍA; ROJAS, 2011) and correlated with the severity of the infection (SÁNCHEZ et al., 2006). Thus, non-classical monocyte population might be inversely associated with capacity to deal with intracellular pathogens.

As monocytes directly participate in the inflammation generated during the abovementioned diseases, and non-classical monocytes might contribute to this chronic inflammation; in this work we hypothesized that monocytes from obese individuals with diabetes may be involved in the risk of developing TB, and wished to explore whether the effect of a high proportion of non-classical monocytes in severe obesity (BMI > 35 kg/m²) and uncontrolled obesity-related diabetes (OBDM) (glycosylated Hb level > 6,5%) differed from that found in patients with TB.

2. Material and Methods

2.1 Study population

This study is part of a major project (DietBra Trial) that was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the Clinics Hospital of the Universidade Federal de Goiás (protocol number 747.792). Forty-five severely obese individuals (BMI > 35 kg/m²) aged between 18 to 65 years old and living in Goiânia and/or the metropolitan area were recruited from a single blind randomized clinical trial. The study was performed at the Outpatient Clinic of Nutrition in Severe Obesity (ANOG) of the Clinics Hospital of the Universidade Federal de Goiás (HC/UFG). Patients were sent to ANOG through the Municipal Health Center (Secretaria Municipal de Saúde - SMS) or through other clinics from HC/UFG; therefore, every patient in this study was from the Unified Health System of Goiânia (Sistema Único de Saúde - SUS). The inclusion criteria were OB

patients with or without DM, dyslipidemia, metabolic syndrome or arterial hypertension. A recruit was excluded from the study for the following: underwent bariatric surgery or lost 5% of body weight in the previous three months; had been previously treated at ANOG; or was using aspirin and antioxidants, was pregnant or lactating, or was an alcoholic. Additionally, patients were excluded if they were receiving nutritional or medical treatment for weight reduction, had received some type of nutritional treatment in the last 2 years, were using anti-obesity drugs like statins, or had food allergies or any disability. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki for experiments with human beings. The subjects participated in the study voluntarily and signed informed consent prior to participation.

Samples from active TB patients (All TB patients were selected on clinical symptoms of tuberculosis confirmed by thorax radiography suggestive of TB. Sputum from all 21 patients with suggestive tuberculosis was processed for acid fast staining and culture. However sample from five patients did not produce positive results in culture but responded positively to the anti-TB treatment) recruited within 15 days of treatment and asymptomatic healthy control individuals with normal blood parameters (controls) who were tuberculin skin test negative and SPOT-TB negative were obtained from the biological sample collection of the Immunopathology and Tropical Diseases Laboratory from the Tropical Pathology and Public Health Institute (IPTSP-UFG) under an approved protocol (CEP/HC/UFG number 055/2009).

2.2 Blood collection and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation

Blood samples were harvested for serum and PBMC separation in the morning after 12 hours of fasting, in a reserved room next to the clinics where the patients were being interviewed. Another 10 mL of blood was collected into a clot accelerator tube to obtain serum, which was stored at -80°C for analysis.

PBMCs were isolated by Ficoll density gradient separation (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences) of heparinized blood. After isolation, the cells were counted in a Neubauer chamber; the concentration was adjusted to 1×10^6 cells/mL, and the cells were frozen with dimethyl sulfoxide (DMSO) at -80°C for analysis. For culture and flow cytometric analysis, the cells were gently thawed, washed three times with RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) and transferred to 24 (500 μ L) or 96 (200 μ L)-well plates at a concentration of 10^6 cells/well with RPMI (GIBCO,

Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 nM glutamine, 10 nM pyruvate, 2 nM non-essential amino acids, 50 µg/mL streptomycin, 50 µg/mL penicillin and 10% heat-inactivated fetal calf serum.

2.3 Circulating monocyte flow cytometry analysis

The following antibodies were used for labeling surface and intracellular molecules for flow cytometry analysis: FITC CD206 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone 87315)/ FITC TLR-2 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone TL2.1)/ FITC IL-6 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone MQ2-13A5), PE CD86 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone GL1)/PE TLR-4 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone HTA125) PE IL-12p40/23 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone eBioHP40), PercP CD14 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone 61D3) and APC CD16 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone B73.1), APC CD11b (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA clone ICRF44). Cells were treated with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% sodium azide for 20 min before antibody labeling. After centrifugation (3000 x g for 10 min), the cells were labeled for 30 min at 4°C with the following labeled surface-marker antibodies: FITC (CD206/TLR-2), PE (CD86/TLR-4), PercP (CD14) and APC (CD16/CD11b). The plates were then washed twice with PBS/0.05% sodium azide and fixed with Perm Fix (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) for 20 min. For intracellular labeling, cells were permeabilized with Perm Wash (BD Bioscience Pharmingen) and incubated for 20 min at 4°C with the following labeled antibodies: FITC (IL-6) BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA) and PE (IL-12p40/23) (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). After washing, the samples were immediately analyzed using a FACS Verse (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) in the Multiuser Laboratory at the Veterinary School of the Universidade Federal de Goiás (UFG). At least 50,000 events were acquired for each sample. Data analysis was performed with the software FlowJo Vs 7.0.

2.4 In vitro infection of monocytes with *M. tuberculosis* (H37Rv) and *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*.

PBMCs were plated in 24-well polystyrene plates with 3-mm glass slides at the bottom using RPMI-1640 culture medium (GIBCO, Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 nM glutamine, 10 nM pyruvate, 2 nM non-essential amino acids, 50 µg/mL streptomycin, 50 µg/mL penicillin and 10% heat-inactivated fetal calf serum. After plating, the cells were incubated for 3 hours with no stimulus to allow the monocytes to adhere to the glass slide, after which the cells were washed with RPMI

(37°C) to remove non-adherent cells. *In vitro* Mtb (H37Rv) infection was performed at a 1:1 multiplicity of infection (MOI) in incomplete RPMI without streptomycin, kanamycin or penicillin for 2 hours. The cells were then washed with RPMI (37°C) supplemented with 100 µg/mL kanamycin. One plate was incubated for 24 hours at 37°C to determine the number of phagocytosed mycobacteria, and the other plate was incubated for 24 and 48 hours for quantification of cytokines and nitric oxide released into the medium. Cells were also harvested on the glass slides for Fite-Faraco staining.

2.5 Colony forming unit (CFU) determination

After 24 hours of incubation, cells were washed twice with PBS (37°C), lysed with 200 µL of PBS 0.05%/Triton X-100, and serially diluted 10^{-1} , 10^{-2} , and 10^{-3} . Next, 50 µL of each dilution was plated in duplicate on 7H11 Middlebrook agar supplemented with oleic acid-albumin-dextrose-catalase. The plates were incubated for 3 weeks at 37°C in a 0.05% CO₂ atmosphere.

2.6 Cytokine analyses

The serum or supernatant of cell cultures was used for adiponectin (limit of detection: 1.64 pg /mL), TNF- α (limit of detection: 6 pg/mL) and TGF- β (limit of detection: 8 pg/mL) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions; Human Adiponectin Platinum ELISA, TNF- α and TGF- β ELISA Ready-SET-Go (eBioscience, USA) kits were used. Optical density (OD) at 450 nm was obtained using an ELISA reader (Thermo LabSystems Multiskan RC/MS/EX Microplate Reader). For each cytokine, a standard curve was calculated from the readings of different concentrations of recombinant cytokines provided by the commercial kits. The obtained OD values were then converted to actual concentrations based on the respective cytokine standard curve.

2.7 Nitric oxide determination

Supernatants (100 µL) from monocyte cultures that had been infected with Mtb were stored in a 96-well plate at -20°C until use. Fifty microliters of the supernatant was transferred to another 96-well plate, and 50 µL Griess reagent (1% sulphanilamide, 2% phosphoric acid, and 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride) was added. The samples were incubated for 15 min at room temperature, protected from light. A serial dilution of nitrite was included in separate wells to provide a standard curve for

comparison. Absorbance at 595 nm was measured using a spectrophotometer (Thermo LabSystems Multiskan RC/MS/EX Microplate Reader).

2.8 Statistical analysis

All results were tabulated using Microsoft Excel software, and graphics and statistical analysis were performed using GraphPad Prism 5 software. Normality was defined using the Shapiro-Wilk test. Variances among parametric results were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's *t* test or Tukey test. Non-parametric results (median fluorescence intensity, MFI analysis) were analyzed by one-way ANOVA, and groups were compared using the Mann-Whitney test. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Study sample characteristics.

Our cohort consisted of a severely obese population of 45 individuals, among whom 22 were OB patients and 25 OBDM patients. Most of the patients were female ($n=40$), with an average age of 40.7 ± 8.8 years. The blood glucose and glycated hemoglobin levels of the diabetic patients were both higher than those of the OB patients (Glucose: 154.4 vs. 101.1; $*p < 0.05$ and Glycated hemoglobin: 7.4 vs. 5.9; $*p < 0.05$). To investigate if either OB or OB in combination with DM is a risk factor for TB development, an active TB patient group and a respective control group were included. As shown in Table 1, 21 active TB individuals were selected. Most were male ($n=18$), with an average age of 40 years old, and had a confirmed TB diagnosis. Ten control individuals with negative tuberculin skin test (TST) were selected (Table 1). The monocytes of all recruited patients were marked for CD14⁺CD11b⁺ and CD14⁺CD16⁺ but we show here only the CD14⁺CD16⁺ cells of 11 selected patients, as this phenotype is better described in the literature.

3.2 OBDM individuals have a mixed population of activated non-classical monocytes.

In vitro, macrophages differentiate toward a pro-inflammatory profile in the presence of glucose (TORRES-CASTRO et al., 2016). Therefore, we hypothesized that higher blood glucose levels in OB patients might influence the phenotype of circulating monocytes. Based on glucose level, glycated hemoglobin and insulin level (HOMA index, Homeostatic Model Assessment), individuals were classified into OBDM and OB

groups, and the three major populations of circulating monocytes in the blood of control, OB and OBDM individuals were evaluated by flow cytometry. Monocyte populations were separated based on expression of CD14 and CD16 molecules into CD14⁺⁺CD16⁻ (classical monocytes), CD14⁺⁺CD16⁺ (intermediate monocytes) and CD14⁺CD16⁺ (non-classical monocytes) groups. Through analysis of these monocyte populations, we calculated the MFI of the molecules CD86 (the co-stimulatory protein, also known as B7-2, which binds to CD28 and CTLA-4, present on antigen-presenting cells and working with CD80 to prime T cells) and CD206 (Mannose receptor). According to the results, classical and intermediate monocytes from OBDM patients had higher expression of CD86 than did healthy individuals or OB patients (Figure 1A and 1C; *p<0.05). Conversely, no difference in expression of CD206 was observed among the populations (Figure 1B and D; p>0.05).

However, when analyzing non-classical monocyte populations, we found that monocytes from both OB and OBDM patients had higher expression of CD86 and CD206 than did monocytes from control individuals. Nevertheless, non-classical monocytes from OBDM individuals still showed increased expression of CD86 and CD206 compared to the OB group (Figure 1E; *p<0.05). Furthermore, non-classical monocytes were the only cell type that presented differential expression of CD86 between the OB and control groups. Maybe the metabolic changes in OBDM patients caused the increase of non-classical monocytes levels that express both CD86 and CD206 (LUMENG et al., 2007).

3.2 Non-classical monocytes from OBDM patients are similar to active TB non-classical monocytes.

Considering the alterations in monocytes during DM and the historical relationship between DM and TB, we sought to determine whether non-classical monocytes population could be related in both diseases. Although we analyzed peripheral monocytes, in regard to TB, Mtb interacts with macrophages through complement receptors, TLRs and CD206, inducing activation of the cells and promoting an inflammatory response as well as increased expression of activation molecules (BAFICA et al., 2005; HETLAND; WIKER, 1994; RIVERA-MARRERO et al., 2002). As the response profile of TB infection is similar to that in other inflammatory diseases such as DM, we questioned whether similarities might exist in the circulating monocyte phenotype in both illnesses once this may increase the likelihood of an OBDM individual developing TB.

To address this question, the circulating monocyte populations of control, OB, OBDM and active TB patients were analyzed. As shown in Figure 2A, classical, intermediate and non-classical monocyte populations were identified by flow cytometry. Compared to control individuals, cells isolated from all patient groups exhibited decreased numbers of classical monocytes (Figure 2B, $p < 0.05$) and an increase in both intermediate and non-classical monocytes (Figure 2C and 2D, $p < 0.05$). Furthermore, the percentage of each monocyte population was altered in a similar manner in the different disease states, which prompted us to consider that these cells may participate in the pathology of OB, OBDM and active TB patients.

Next, expression levels of CD86 and CD206 in monocytes from TB compared to OB and OBDM patients were evaluated. Expression levels of CD86 and CD206 in classical (3A and 3B) and intermediate (3C and 3D) monocytes were assessed, and the results are presented in Figure 3. Classical and intermediate monocytes from OBDM individuals presented CD86 MFI higher than all the other groups. No differences were observed on the CD206 level of expression. Increased levels of CD86 MFI were observed on non-classical monocytes among all groups investigated (Figure 3 E) when compared to healthy controls. In a similar trend, the expression of CD206 among non-classical monocytes was increased in OBDM and TB patients (Figure 3F) compared to OB and healthy controls.

In light of these results, we conclude that active TB, OB, and OBDM patients have a similar phenotype of non-classical circulating monocytes, indicating a possible function of these cells in both illnesses and a possible connecting point in the historical association between tuberculosis and diabetes.

3.4 Activation of circulating monocytes in OBDM does not affect cytokine production.

To further investigate a possible similarity in function of these cells, we measured the production of cytokines by the non-classical monocyte population using flow cytometry. We evaluated the production of two main inflammatory cytokines, IL-12 and IL-6, which are both important for the establishment of inflammation and are related to the immune responses of TB and OBDM. To our surprise, significant production of the cytokines was only found in active TB patients (Figures 4A and 4B).

Different cell populations produce a variety of inflammatory cytokines that contribute to the inflammatory state of these diseases. For instance, TNF- α , produced

mainly by activated macrophages, is implicated in insulin resistance in DM, and TGF- β , produced by many cell types, results in differentiation of Th17 cells, which is important in both diseases; adiponectin, produced exclusively by adipocytes, is also related to insulin resistance (BRAGA GOMES; FONTANA RODRIGUES; PAULA FERNANDES, 2014; SWAROOP; RAJARAJESWARI; NAIDU, 2012; XITA; TSATSOULIS, 2012). Adiponectin has also been considered a serum marker for severity of tuberculosis infection, and hence was found increased in the serum of active TB patients (ELNEMR et al., 2015; KEICHO et al., 2012). We investigated the serum levels of adiponectin and found that it was similarly increased in TB and OBDM patients (Figure 4C). We also investigated the systemic production of inflammatory cytokines by testing serum from these patients. We found that TNF- α levels were not different from control individuals (Figure 4E) and that TB patients showed decreased TGF- β production (Figure 4D). As cytokine production was not similar between the diseases, we investigated the activation and microbicide capacity of monocytes in both illnesses.

3.5 Expression of TLRs is similar between OBDM and TB patient monocytes.

It is known that in OB and other metabolic diseases, the presence of free fatty acids and glucose can lead to activation of macrophages through interaction with TLR-2 and TLR-4 (BAHAT et al., 2012). These same receptors are also crucial for the recognition of Mtb by several innate immunity cells. To determine whether the expression profiles of these molecules in circulating monocytes are similar for both diseases, the MFI of TLR-2 and TLR-4 in CD14⁺CD11b⁺ monocytes from the peripheral blood of control, OB, OBDM and active TB patients was evaluated (Figure 5A); as CD11b is a global marker of monocytes, the CD14⁺CD11b⁺ population was chosen for analysis such that all three CD14/CD16 monocyte populations could be investigated. Based on our results, TLR-2 expressions were increased in OB and TB, but OBDM presented a tendency to increase as well (Figure 5B); in contrast, TLR-4 expressions were reduced compared to the healthy control group (Figure 5C). These data suggest that TLR-2 signaling may be involved in the inflammation process in both diseases, reinforcing the importance of monocytes in these conditions.

3.6 OB and OBDM contribute to *M. tuberculosis* growth in monocytes.

It has been observed that monocytes from OB and OBDM individuals share similarities with monocytes from active TB patients. TLRs are important receptors for

inflammation initiation in both diseases and are largely related to Mtb phagocytosis. The similarity between these cells, together with the fact that TLR-2 levels were altered in both OBDM and TB patients, prompted us to assess if similar alterations in monocyte TLR expression, result in a change in cellular killing capacity that may be implicated in TB susceptibility in DM patients. Macrophages derived from the monocytes from control, OB, OBDM and active TB patients were infected with Mtb *in vitro* for 24 and 48 hours. After *in vitro* infection, macrophages from OB patients were more permissive to Mtb growth, whereas OBDM and TB patient macrophages exhibited similar increases in Mtb growth, which was higher than that in macrophages from the OB and control individuals (Figure 6A). Nitric oxide production by these cells during infection was also measured, with greater production by OBDM and TB monocytes observed after 24 (Figure 6B) and 48 (Figure 6C) hours.

To assess whether Mtb cell wall components or virulence factors exclusive to Mtb were responsible for this phenomenon, we repeated the *in vitro* infection using *M. abscessus* subsp. *massiliense*, a rapidly growing environmental mycobacterium. We observed that the growth of *M. abscessus* subsp. *massiliense* remained unaltered, independent of the monocyte with which it was cultured. After 48 hours of infection, overall bacterial growth was reduced by almost one log, as expected for this bacterium (Figure 7). This result suggests that components exclusive to Mtb may play a role in its survival in TB and OBDM monocytes.

4. Discussion

Our data confirm the previous literature where non-classical circulating monocytes were increased in obese individuals [10-15]. Additionally, we show for the first time that this cellular involvement occurs among OBDM and OB patients with body mass index (BMI) greater than 35 kg/m². Classical and intermediate monocytes from OBDM patients presented higher levels of CD86 expression, while non-classical monocytes from OBDM patients presented increased CD86 and CD206 levels when compared to OB individuals. Non-classical monocytes from OBDM patients had similar levels of CD86 expression as those from TB patients. However only the non-classical monocytes from TB patients had increased expression of IL-12 and IL-6 cytokines that did not correlate with the TLR-2 expression increase seen in all patient groups. Interestingly the expression of TLR-4 was reduced similarly in all groups. Despite the

differences in pro-inflammatory cytokine expression observed on monocytes from OBDM and TB individuals, they were both more permissive to *Mtb* growth but not to other mycobacteria (*M. abscessus* subsp. *massiliense* for example), when compared to OB and control individuals, suggesting that maybe monocytes could be one of the common factors associated with increased TB susceptibility.

In this work, it was found that the subpopulations of monocytes were increased, as expected, in OBDM patients (DEVÊVRE et al., 2015), whereas in OBDM, only non-classical monocytes exhibited mixed expression of the surface markers CD86 and CD206. Moreover, expression of CD86 by OBDM patients differed from OB patients only with regard to the non-classical population. CD86 is a costimulatory molecule present in antigen-presenting cells important for the generation of the specific immune response [29]. High expression of this molecule by monocytes has been associated with the development of inflammatory M1 macrophages [30]. CD206 is a C-type lectin, also known as mannose receptor, previously described as participating in the phagocytosis of pathogens such as *Mtb* [31] and is related to insulin resistance in human obesity [32]. The increased expression of these molecules could reflect the inflammatory state of these conditions, as CD206, for instance, could mediate inflammation through recognition of DAMPs resulting in release of pro-inflammatory cytokines like IL-1 β and IL-6 [33]. As for CD86, the expression of this molecule has already been correlated with inflammation and production of TNF- α , IL-18, IL-8 and other inflammatory cytokines [34], corroborating with our findings.

As macrophages participate directly in the pathology of both diseases, we analyzed circulating monocyte profiles in OBDM and TB patients. Although the non-classical monocytes of these individuals expressed both CD86 and CD206, there was a predominance of CD86 expression. In the tissue, macrophages with a CD206⁺ profile have also been defined as inflammatory and contribute to insulin resistance, metabolic syndrome and DM development (FESSLER; RUDEL; BROWN, 2009; WENTWORTH et al., 2010). An increase in inflammatory CD86 monocytes in TB patients, could contribute to tissue damage in the lungs, once this cells infiltrate and differentiate into inflammatory macrophages, worsening the disease [36].

In the liver and subcutaneous tissues of OBDM patients, there is a predominance of M1 pro-inflammatory macrophages (TREM-1, CD86, CCR-7, iNOS, IFN- γ , TNF- α , IL-6, MCP-1, CCR-2 and CCR-5) and a reduction in M2 macrophages (TREM-2, CD163, IL-4 and IL-10) compared to obese and lean individuals (ANDRADE et al., 2014). As

observed in OBDM patients, macrophages from OB patients, also increased these molecules that are mostly associated with M1 markers (ANDRADE et al., 2014). Circulating classical monocytes from healthy individuals preferentially differentiate into M1 macrophages, while non-classical monocytes into M2 macrophages [38]. Our data, however, demonstrate that for OBDM and TB patients, the non-classical monocytes have a mixed expression of molecules (CD86 and CD206). Moreover, non-classical monocytes from TB patients showed a tendency towards M1 polarization, once these cells were positive for IL-12 and IL-6 (Figure 4). Furthermore, despite the belief that non-classical monocytes are the source of M2 macrophages, it was characterized here and by others that in OB, as well as in TB, these cells produce mostly inflammatory cytokines like IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-12 [15,16], which are cytokines classically produced by M1 macrophages.

The M1/M2 paradigm should be evaluated with caution, as monocyte phenotypes are very plastic and any variation in the microenvironment of the host, like obesity/diabetes, could influence the polarization of these cells. Due to the intrinsic high production of pro-inflammatory cytokines within the microenvironment of those tissues, circulating monocytes might be modulated toward an M1 profile, as observed in this study (Figures 1 and 5), favoring induction of insulin resistance, although the authors are aware that more markers are needed to completely define an M1 population.

Although we observed similarity in the expression of activation molecules in monocytes from TB and OBDM patients, only those from active TB patients showed increased expression of IL-12 and IL-6 (Figure 4), but the TGF- β blood levels were decreased. This fact might be explained because during Mtb infection, interaction of PAMPs from the bacterial cells results in direct activation of monocytes and these cells could be previously activated, while the monocytes from OB patients were not. The difference in cytokine production generates a paradox, because obesity and TB are chronic inflammatory diseases that could induce monocyte activation, but one possible explanation is that the cells from OB and OBDM patients could be in an immune exhaustion state [39] and to a lower degree of innate immune cells [40–42]. Thus, the absence of cytokine production by OB and OBDM cells could reflect an inability of these cells to respond to an infection. In addition, in the studied diseases no increase of TNF- α level was observed. It is very well known that IL-12 and TNF- α are important macrophage activators that significantly contribute to the control of Mtb infection

[43,44]. Maybe the inability of non-classical monocytes from OB and OBDM patients to produce those cytokines could contribute to an increased risk of TB development.

Our results demonstrate that in relation to healthy individuals, OB and active TB patients have increased expression of TLR-2 in circulating monocytes (Figure 5). In contrast, expression of TLR-4 is reduced in OB, OBDM and active TB patients. There are many questions about the factors that predispose OBDM individuals to develop TB. It was recently demonstrated that macrophages from overweight DM individuals (BMI=28 kg/m²) exhibit defects in phagocytosis of *M. bovis* BCG (RAPOSO-GARCÍA et al., 2017), prompting us to question whether the phagocytosis receptors of these monocytes could be defective in the internalization of Mtb, as it is the main etiologic agent of TB, and also *M. abscessus* subsp. *massiliense*, a rapidly growing mycobacteria.

We have shown a reduction in TLR-4 in circulating monocytes in OB and OBDM individuals (Figure 5). One of the possible explanations for this reduction is that these receptors might be unavailable for identification on the monocyte surface due to internalization of bonded receptors. This interaction promotes activation of this cells resulting in production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α and adhesion molecules that promote inappropriate recruitment of circulating monocytes to adipose tissue (SHI et al., 2006). However, our results show that in circulation, those monocytes do not possess the ability to produce some of these cytokines (Figure 4), even after activation of TLR-4 due to a possible immune exhaustion as already discussed above.

When monocytes are infected with Mtb, increased bacterial growth can be observed in the cells of OBDM individuals (BMI>40) in relation to monocytes from healthy individuals. This phenomenon is similar to that found for the macrophages of active TB individuals (Figure 6). The increase in TLR-2 in monocytes from OBDM and active TB patients might contribute to enhanced Mtb growth, as the TDM present in the Mtb cell wall interacts with TLR-2, which leads to infection and disease (KIM et al., 2010). In its many centuries of coevolution with the human host, Mtb has developed several mechanisms to evade the immune system, including exploiting TLR-2 activation. Some proteins secreted by Mtb (such as hsp60 and PPE18) can induce production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in a TLR-2 dependent manner by human macrophages (PARVEEN et al., 2013). An important virulent factor of Mtb, the protein ESAT-6 is also reported to bind to TLR-2 and inhibit production of IL-12, a cytokine that is crucial for eliminating Mtb (PATHAK et al., 2007). Furthermore, several Mtb lipoproteins can interact with TLR-2 and inhibit MHC-II antigen presentation (GEHRING et al., 2004;

PECORA et al., 2006). Taken together, the findings suggest that metabolic changes due to DM may facilitate Mtb growth in monocytes through increased TLR-2 expression.

A different result was observed when monocytes were infected with *M. abscessus* subsp. *massiliense*, as bacterial growth was not changed among the tested groups (Figure 7). As demonstrated by Kim et al, (KIM et al., 2014), *M. abscessus* subsp. *massiliense* can interact with TLR-2, although this interaction did not result in advantage for *M. abscessus* subsp. *massiliense*, as with Mtb. These results suggest that *M. abscessus* subsp. *massiliense* lack some evasion mechanism present in Mtb, due to the different composition of their cell walls; demonstrating that there could be a mycobacterial factor involved in the growth inhibition, besides the differences among monocytes. Also, the different environment in which these cells were (the patient) before in vitro challenge may also influence the outcome of this assay.

Although the conditions in which we cultured the monocytes for infection with both bacteria were the same, the cells came from different patients with different inflammatory and metabolic states (specially OBDM patients) that could have influenced the monocytes to be less able to control the infection by Mtb. We believe that the increase in TLR-2 and CD206 could contribute to the diminished capacity of OBDM and TB macrophages to control the multiplication of Mtb, and not to *M. abscessus* subsp. *massiliense* due to the better adaptation of Mtb to evade cellular microbicide responses through TLR-2 manipulation [50,51]. Further, a degree of immune exhaustion could be present in the OBDM cells due to the chronic inflammatory state where these cells were generated [41], that could render the macrophages functionally less capable of eliminating a more pathogenic bacteria like Mtb. These findings are in line with other studies that demonstrate lesser capacity of DM derived macrophages to eliminate several strains of Mtb [40].

It has been observed that in OB, alterations in adipokine metabolism result in dysregulation in the production of adiponectin, which is reduced in obese individuals (MAURY; BRICHARD, 2010). It is known that adiponectin is related to activation of dendritic cells, leading to polarization of TCD4⁺ into Th1 and Th17 cells [54]. Many papers already described the production and the function of adiponectin in obesity [53] and diabetes [55]; in our work the elevated serum levels of adiponectin of TB patients was expected as it is described that this adipokine is a modulator of inflammation and has been considered a serum marker for severity of tuberculosis infection [26,27]. It is also suggested that Mtb use the adipose tissue to hide from the immune system and persist in

the host, generating an increased production of adiponectin by the adipose tissue [27]. The presence of elevated levels of adiponectin in both obesity and tuberculosis reinforces the possible connection of these two diseases.

The authors recognize that the number of patients in this study was not ideal, but as all the evaluations were repeated three times with consistent results, we believe that the results obtained are accurate. Another limitation of this study is that it was not possible to test the OB patients for latent tuberculosis infection due to a shortage of PPD availability in Brazil. The sex differences in the studied groups may also be an issue, but alterations in monocyte populations, especially non- classical monocytes, have been shown to be independent of sex and age in obesity [10]. The authors also recognize the limitations in not performing a sorting assay to better define if non-classical monocytes could be responsible for TB susceptibility.

The results presented herein suggest that the non-classical monocyte population may be a link between OBDM and TB and may be one of the factors that contribute to the association of these two diseases, due to various phenotypical and functional similarities found in these cells in both diseases. Although, some differences are still present (cytokine production) that may be relevant to confirm this association. We conclude that obesity induced diabetes and tuberculosis present several immune similarities, especially in the population of circulating non-classical monocytes, and this similarities are another step in the understanding of the association of these two diseases. Nevertheless, further studies should be conducted to clarify the differences found and to determine the mechanisms involved in this phenomenon.

5. Acknowledgments

The authors thank the Laboratório Profa. Margarida Dobler Komma - IPTSP - UFG for biochemistry measurements, the Laboratório multiusuário de cultura de células – Escola de Veterinária e Zootecnia – UFG for flow cytometer use, the Secretaria municipal de Saúde de Goiânia, and the clinical research unit of Hospital das Clínicas-UFG. Dr. Erika Aparecida da Silveira is the principal investigator of the project DietBra Trial, which examines nutritional aspects of severe obesity. This work is part of DPR PhD thesis at Tropical Medicine and Public Health Graduate Program from CAPES with financial support of CNPq.

6. Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

7. Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development, Brasília, DF, Brazil [grant number 303675/2015-2] and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás, Goiânia, GO, Brazil [grant number 05-2012].

8. References

- ABDELSALAM, S. S. et al. The Role of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP)-1B in Cardiovascular Disease and Its Interplay with Insulin Resistance. **Biomolecules**, v. 9, n. 7, p. 286, 17 jul. 2019.
- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH₂-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser³⁰⁷. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 9047–9054, 24 mar. 2000.
- AHMAD, R. et al. Increased adipose tissue expression of TLR8 in obese individuals with or without type-2 diabetes: Significance in metabolic inflammation. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, 2016.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006.
- AL-GOBLAN, A. S.; AL-ALFI, M. A.; KHAN, M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy**, v. 7, p. 587–91, 2014.
- ALVIM, R. O. et al. General aspects of muscle glucose uptake. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 351–368, 6 mar. 2015.
- AMRANI, A. et al. Interleukin-1 effect on glycemia in the non-obese diabetic mouse at the pre-diabetic stage. **The Journal of endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 139–48, jan. 1996.
- ANDRADE, B. B. et al. Mycobacterial Antigen Driven Activation of CD14⁺⁺CD16[–] Monocytes Is a Predictor of Tuberculosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004433, 2 out. 2014.

AZEVEDO, M. J.; GROSS, J. L. Aspectos especiais da dieta no tratamento do diabetes melito. **Rev. AMRIGS**, v. 34, n. 3, p. 181–6, [s.d.].

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715–1724, 2005.

BAHAT, G. et al. Which body mass index (BMI) is better in the elderly for functional status? **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 54, n. 1, p. 78–81, jan. 2012.

BESSESEN, D. H. Update on obesity. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 6, p. 2027–34, jun. 2008.

BHATTACHARYYA, S. et al. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I B kinase activity. **Blood**, v. 104, n. 4, p. 1100–1109, 22 abr. 2004.

BHAUMIK, S.; BASU, R. Cellular and Molecular Dynamics of Th17 Differentiation and its Developmental Plasticity in the Intestinal Immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

BI, J.; TIAN, Z. NK cell exhaustion. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUN, 2017.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C. R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 1, 1 jan. 2014.

BRACE, P. T. et al. *Mycobacterium tuberculosis* subverts negative regulatory pathways in human macrophages to drive immunopathology. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 1–25, 2017.

BRAGA GOMES, K.; FONTANA RODRIGUES, K.; PAULA FERNANDES, A. The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Nephropathy. **International Journal of Medical Genetics**, v. 2014, p. 6, 2014.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 15, n. 4, p. 798–808, abr. 2007.

BURGDORF, S.; KURTS, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 1, p. 89–95, 2008.

- CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J.; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 16 Suppl 1, n. Suppl1, p. S27-36, mar. 2012.
- CASTAÑO, D.; GARCÍA, L. F.; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16+monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v. 91, n. 5, p. 348–360, 2011.
- CASTRO, G. et al. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. **Elsevier**, v. 3, p. 443–449, 2013.
- CHO, H. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and Obesity. In: **Vitamins and hormones**. [s.l: s.n.]. v. 91p. 405–424.
- CHOI, K.; KIM, Y.-B. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. **The Korean journal of internal medicine**, v. 25, n. 2, p. 119–29, jun. 2010.
- COLLINS, S. et al. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 243–248, abr. 2004.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 4, p. e73, 22 abr. 2016.
- COUSINS, D. V et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, n. Pt 5, p. 1305–14, set. 2003.
- DEVÊVRE, E. F. et al. Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3917–3923, 2015.
- DIBASE, J. K. et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. **Mayo Clinic proceedings**, v. 83, n. 4, p. 460–9, abr. 2008.
- ELLULU, M. S. et al. Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. **Archives of Medical Science**, v. 13, n. 4, p. 851–863, 2017.
- ELNEMR, G. M. et al. Adiponectin Levels as a Marker of Inflammation in Pulmonary Tuberculosis. v. 59, p. 208–213, 2015.
- FAN, W. et al. Hepatitis B vaccine response in obesity: A meta-analysis. **Vaccine**, v.

34, n. 40, p. 4835–4841, 2016a.

FAN, W. et al. Hepatitis B vaccine response in obesity: A meta-analysis. **Vaccine**, v. 34, n. 40, p. 4835–4841, 14 set. 2016b.

FERNÁNDEZ SOTO, G. F. et al. Mycobacterium tuberculosis infection: Participation of TH1, TH2, TH17 and regulatory T cells in the immune response. **Acta Medica Iranica**, v. 56, n. 8, p. 484–493, 2018.

FERNSTRÖM, M. et al. Improved Muscle Mitochondrial Capacity Following Gastric Bypass Surgery in Obese Subjects. **Obesity surgery**, 15 out. 2015.

FESSLER, M. B.; RUDEL, L. L.; BROWN, J. M. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. **Current Opinion in Lipidology**, v. 20, n. 5, p. 379–385, out. 2009.

FESTA, A. et al. Elevated Levels of Acute-Phase Proteins and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Predict the Development of Type 2 Diabetes: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1131–1137, 1 abr. 2002.

FINDLAY, E. G.; HUSSELL, T. Macrophage-Mediated Inflammation and Disease: A Focus on the Lung. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

FLIER, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 337–50, 23 jan. 2004.

FRÜHBECK, G. et al. Regulation of adipocyte lipolysis. **Nutrition Research Reviews**, v. 27, n. 1, p. 63–93, 28 jun. 2014.

FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446–450, 13 dez. 2013.

GEHRING, A. J. et al. Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 4, p. 2660–8, 15 ago. 2004.

GONDRET, F.; FERRÉ, P.; DUGAIL, I. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 1, p. 106–13, 1 jan. 2001.

GORNIK, I.; GORNIK, O.; GAŠPAROVIĆ, V. HbA1c is outcome predictor in diabetic

patients with sepsis. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, n. 1, p. 120–125, jul. 2007.

GREEN, W. D.; BECK, M. A. Obesity impairs the adaptive immune response to influenza virus. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 14, n. November, p. S406–S409, 2017.

GRIFFIN, B. A. Lipid metabolism. **Surgery (United Kingdom)**, v. 31, n. 6, p. 267–272, 2013.

GUPTA, N. et al. Childhood Obesity in Developing Countries: Epidemiology, Determinants, and Prevention. **Endocrine Reviews**, v. 33, n. 1, p. 48–70, 1 fev. 2012.

GUSTAFSON, B. et al. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 193–200, abr. 2015.

HAAS, J. T. et al. Hepatic Insulin Signaling Is Required for Obesity-Dependent Expression of SREBP-1c mRNA but Not for Feeding-Dependent Expression. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 873–884, 6 jun. 2012.

HAMEED, I. et al. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 4, p. 598–612, 15 maio 2015.

HATANAKA, E. et al. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 3, p. 443–447, dez. 2006.

HETLAND, G.; WIKER, H. G. Antigen 85C on Mycobacterium bovis, BCG and M. tuberculosis promotes monocyte-CR3-mediated uptake of microbeads coated with mycobacterial products. **Immunology**, v. 82, n. 3, p. 445–9, jul. 1994.

HUANG, X. et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. **International journal of biological sciences**, v. 14, n. 11, p. 1483–1496, 2018.

IBGE :: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_e_ncaa/default.shtm>. Acesso em: 12 jun. 2019.

IQBAL, J.; HUSSAIN, M. M. Intestinal lipid absorption. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1183-94, jun. 2009.

- ISRAËL, A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 3, p. a000158, mar. 2010.
- JEON, C. Y.; MURRAY, M. B. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 7, p. e152, 15 jul. 2008.
- JOHNSON, P. R. et al. Animal Models of Obesity: Genetic Aspects. **Annual Review of Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 325–353, jul. 1991.
- JUMPERTZ, R. et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 58–65, 1 jul. 2011.
- KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494–1505, 1 jun. 2006.
- KEICHO, N. et al. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: Markers of metabolism and inflammation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 2–9, 2012.
- KEITH, S. W. et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. **International journal of obesity (2005)**, v. 30, n. 11, p. 1585–94, 27 nov. 2006.
- KENNEDY, A. et al. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 1, p. 1–4, 3 dez. 2008.
- KIM, M.-J. et al. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 258–274, jul. 2010.
- KIM, T. S. et al. Mycobacterium massiliense induces inflammatory responses in macrophages through Toll-like receptor 2 and c-Jun N-terminal kinase. **Journal of clinical immunology**, v. 34, n. 2, p. 212–23, fev. 2014.
- KUREBAYASHI, Y. et al. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 Axis Controls Th17 Differentiation by Regulating Gfi1 Expression and Nuclear Translocation of ROR γ . **Cell Reports**, v. 1, n. 4, p. 360–373, 19 abr. 2012.

- KWAIJTAAL, M. et al. Exhaustion is associated with low macrophage migration inhibitory factor expression in patients with coronary artery disease. **Psychosomatic Medicine**, v. 69, n. 1, p. 68–73, 2007.
- LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 15–28, 10 jan. 2016.
- LAMAS, O.; MARTINEZ, J. A.; MARTI, A. T-helper lymphopenia and decreased mitogenic response in cafeteria diet-induced obese rats. **Nutrition Research**, v. 22, n. 4, p. 497–506, 1 abr. 2002.
- LARGE, V. et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. **Diabetes & metabolism**, v. 30, n. 4, p. 294–309, set. 2004.
- LEE, J. Y. et al. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16683–16689, 18 maio 2001.
- LEISCHING, G. R. Susceptibility to Tuberculosis is associated with PI3K-dependent increased mobilization of neutrophils. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUL, 2018.
- LIN, Y. et al. The Hyperglycemia-induced Inflammatory Response in Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4617–4626, 11 fev. 2005.
- LIU, F.; GUO, Z.; DONG, C. Influences of obesity on the immunogenicity of Hepatitis B vaccine. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 5, p. 1014–1017, 2017a.
- LIU, F.; GUO, Z.; DONG, C. Influences of obesity on the immunogenicity of Hepatitis B vaccine. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, n. 5, p. 1014–1017, 4 maio 2017b.
- LÖNNROTH, K. et al. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. **The Lancet**, v. 375, n. 9728, p. 1814–1829, 2010a.
- LÖNNROTH, K. et al. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. **International journal of epidemiology**, v. 39, n. 1, p. 149–55, fev. 2010b.
- LOPEZ-LOPEZ, N. et al. Type-2 diabetes alters the basal phenotype of human macrophages and diminishes their capacity to respond, internalise, and control Mycobacterium tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, p. 1–

11, 2018.

LUMENG, C. N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MANSBACH, C. M.; SIDDIQI, S. A. The biogenesis of chylomicrons. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 315–33, 2010.

MASTERS, S. L. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β 2 in type 2 diabetes. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 897–904, 2010.

MATTOS, R. T. et al. Chronic Low-Grade Inflammation in Childhood Obesity Is Associated with Decreased IL-10 Expression by Monocyte Subsets. **Plos One**, v. 11, n. 12, p. e0168610, 2016.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 1–16, 15 jan. 2010.

MIN, D. et al. Alterations in Monocyte CD16 in association with diabetes complications. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

MIYAZAKI, A. et al. Protein deficiency reduces efficacy of oral attenuated human rotavirus vaccine in a human infant fecal microbiota transplanted gnotobiotic pig model. **Vaccine**, v. 36, n. 42, p. 6270–6281, 8 out. 2018.

MOLIVA, J. I.; TURNER, J.; TORRELLES, J. B. Immune Responses to Bacillus Calmette-Guérin Vaccination: Why Do They Fail to Protect against Mycobacterium tuberculosis? **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 407, 2017.

NEIDICH, S. D. et al. Increased risk of influenza among vaccinated adults who are obese. **International journal of obesity (2005)**, v. 41, n. 9, p. 1324–1330, 2017.

O'ROURKE, R. W. Inflammation in obesity-related diseases. **Surgery**, v. 145, n. 3, p. 255–9, mar. 2009.

O'SHEA, D. et al. Natural Killer Cells in Obesity: Impaired Function and Increased Susceptibility to the Effects of Cigarette Smoke. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8660, 25

jan. 2010.

OTTAVIANI, E.; MALAGOLI, D.; FRANCESCHI, C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. **General and comparative endocrinology**, v. 174, n. 1, p. 1–4, 1 out. 2011.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457–461, 15 out. 2004.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. Immunity and Immunopathology in the Tuberculous Granuloma. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 6 nov. 2014.

PAL, R. et al. Diabetes Mellitus as Hub for Tuberculosis Infection: A Snapshot. **International Journal of Chronic Diseases**, v. 2016, p. 1–7, 12 out. 2016.

PARK, H. L. et al. Obesity-induced chronic inflammation is associated with the reduced efficacy of influenza vaccine. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 5, p. 1181–1186, 2014.

PARK, H. S.; PARK, J. Y.; YU, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 69, n. 1, p. 29–35, jul. 2005.

PARVEEN, N. et al. Endocytosis of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 60 is required to induce interleukin-10 production in macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 34, p. 24956–71, 23 ago. 2013.

PATHAK, S. K. et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nature Immunology**, v. 8, n. 6, p. 610–618, 7 jun. 2007.

PAVAN KUMAR, N. et al. Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary or latent tuberculosis results in modulation of adipocytokines. **Cytokine**, v. 79, p. 74–81, 2016.

PECHT, T. et al. Circulating Blood Monocyte Subclasses and Lipid-Laden Adipose Tissue Macrophages in Human Obesity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2016.

PECORA, N. D. et al. Mycobacterium tuberculosis LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 1, p. 422–9, 1 jul. 2006.

- PRADHAN, A. D. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. **Jama**, v. 286, n. 3, p. 327–334, 2001.
- PRAHARAJ, I. et al. Probiotics, antibiotics and the immune responses to vaccines. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1671, p. 20140144, 19 jun. 2015.
- RAGGI, F. et al. Regulation of human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by hypoxia and the Triggering receptor expressed on Myeloid cells-1. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2017.
- RAPOSO-GARCÍA, S. et al. Immunological response to Mycobacterium tuberculosis infection in blood from type 2 diabetes patients. **Immunology Letters**, v. 186, n. March, p. 41–45, 2017.
- RESTREPO, B. I. Diabetes and tuberculosis. [s.d.].
- RIVERA-MARRERO, C. A. et al. *M. tuberculosis* induction of matrix metalloproteinase-9: the role of mannose and receptor-mediated mechanisms. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 3, p. L546–L555, mar. 2002.
- RODRIGUES, L. C.; DIWAN, V. K.; WHEELER, J. G. Protective Effect of BCG against Tuberculous Meningitis and Miliary Tuberculosis: A Meta-Analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 22, n. 6, p. 1154–1158, dez. 1993.
- ROSSMEISL, M. et al. Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 52, n. 8, p. 1958–66, ago. 2003.
- SAMPATH, P. et al. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. July, p. 1–8, 2018.
- SANCHEZ, A. et al. Mycobacterium tuberculosis 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 1, p. 20–28, 2009.
- SÁNCHEZ, M. D. et al. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 9–10, p. 2492–2500, 2006.
- SANDERS, F. W. B.; GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and

disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 91, n. 2, p. 452–68, maio 2016.

SANTOS, L. M. P. et al. Trends in Morbid Obesity and in Bariatric Surgeries Covered by the Brazilian Public Health System. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 7, p. 943–948, 7 jun. 2008.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S29–S36, 2003.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 190–195, jan. 2010.

SCRIBA, T. J. et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 3, p. 1962–70, 1 fev. 2008.

SHERIDAN, P. A. et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 8, p. 1072–1077, 25 ago. 2012.

SHI, D.; DAS, J.; DAS, G. Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals. **Cell Research**, v. 16, n. 1, p. 70–74, 16 jan. 2006.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. **The journal of clinical investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 2006.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169–80, 5 maio 2007.

SIMÓ MIÑANA, J. et al. Hepatitis B vaccine immunoresponsiveness in adolescents: a revaccination proposal after primary vaccination. **Vaccine**, v. 14, n. 2, p. 103–6, fev. 1996.

SINDHU, S. et al. Changes in the Adipose Tissue Expression of CD86 Costimulatory Ligand and CD163 Scavenger Receptor in Obesity and Type-2 Diabetes: Implication for Metabolic Disease. **Journal of Glycomics & Lipidomics**, v. 05, n. 04, 10 nov. 2015.

SMITH, S. C.; HASLAM, D. Abdominal obesity, waist circumference and cardio-metabolic risk: awareness among primary care physicians, the general population and

- patients at risk--the Shape of the Nations survey. **Current medical research and opinion**, v. 23, n. 1, p. 29–47, 29 jan. 2007.
- STEW, S. S. et al. Differential expression of monocyte surface markers among TB patients with diabetes co-morbidity. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 93 Suppl, n. 0, p. S78-82, dez. 2013.
- STURM, R. Increases in morbid obesity in the USA: 2000-2005. **Public health**, v. 121, n. 7, p. 492–6, jul. 2007.
- SUMMERS, S. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 1, p. 42–72, jan. 2006.
- SUN, Q. et al. Significance of the frequency of CD4+CD25+CD127– T-cells in patients with pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus. **Respirology**, v. 17, n. 5, p. 876–882, jul. 2012.
- SWAROOP, J. J.; RAJARAJESWARI, D.; NAIDU, J. N. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **The Indian journal of medical research**, v. 135, n. 1, p. 127–30, 2012.
- ŚWIDERSKA, E. et al. Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In: **Glucose Transport [Working Title]**. [s.l.] IntechOpen, 2018.
- TANAKA, S.-I. et al. T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF- α in human obesity: adequate weight reduction can be corrective. **Clinical Endocrinology**, v. 54, n. 3, p. 347–354, 1 mar. 2001.
- TORRES-CASTRO, I. et al. Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. **Immunology Letters**, v. 176, p. 81–89, 2016.
- TROUWBORST, I. et al. Ectopic Fat Accumulation in Distinct Insulin Resistant Phenotypes; Targets for Personalized Nutritional Interventions. **Frontiers in nutrition**, v. 5, p. 77, 2018.
- URIBARRI, J. et al. Elevated serum advanced glycation endproducts in obese indicate risk for the metabolic syndrome: a link between healthy and unhealthy obesity? **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, n. 5, p. 1957–66, maio 2015.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H.; VAN DER MEER, J. W. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 294–309, 2002.

WANG, C.; LIAO, J. K. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. v. 821, n. 5, p. 1–11, 2012.

WANG, T.; HE, C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 44, p. 38–50, 1 dez. 2018.

WENSVEEN, F. M. et al. Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 322–333, 1 set. 2015.

WENTWORTH, J. M. et al. Pro-inflammatory CD11c+ CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. **Diabetes**, v. 59, n. July, 2010.

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 486–499, 2015.

WHITE, J. R. et al. Clarifying the Role of Insulin in Type 2 Diabetes Management. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. 1, p. 14–21, 1 jan. 2003.

WHO. **The end TB STraTegy global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.who.int/tb/strategy/End_TB_Strategy.pdf?ua=1>. Acesso em: 13 jun. 2019a.

WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014** **World Health**. [s.l.: s.n.].

WHO. **Global Tuberculosis Report**. [s.l.: s.n.].

WISSE, B. E.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W. Physiology. An integrative view of obesity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5852, p. 928–9, 9 nov. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Commission of Ending Childhood Obesity. **World Health Organization**, p. 1–50, 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. BCG vaccine: WHO position paper, February

- 2018 – Recommendations. **Vaccine**, v. 36, n. 24, p. 3408–3410, 7 jun. 2018.
- WOUTERS, K. et al. Circulating classical monocytes are associated with CD11c+ macrophages in human visceral adipose tissue. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 42665, 2017.
- WYATT, S. B.; WINTERS, K. P.; DUBBERT, P. M. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. **The American journal of the medical sciences**, v. 331, n. 4, p. 166–74, abr. 2006.
- XITA, N.; TSATSOULIS, A. Adiponectin in diabetes mellitus. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 32, p. 5451–8, 2012.
- XU, X. et al. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. **Seminars in liver disease**, v. 33, n. 4, p. 301–11, nov. 2013.
- YAMASHIRO, S. et al. Lower expression of Th1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 139, n. 1, p. 57, jan. 2005.
- YANG, H. et al. 25(OH)D(3) affects the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells stimulated by *Mycobacterium bovis* BCG. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48062, jan. 2012.
- YORKE, E. et al. The Bidirectional Relationship between Tuberculosis and Diabetes. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2017, p. 1–6, 12 nov. 2017.
- ZABOLOTNY, J. M. et al. Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5187–92, 24 abr. 2001.
- ZAMMIT, C. et al. Obesity and respiratory diseases. **International Journal of General Medicine**, v. 3, p. 335, 2010.
- ZHANG, D. et al. Resistance to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Cell metabolism**, v. 11, n. 5, p. 402–11, 5 maio 2010.
- ZHANG, X. et al. Inhibition of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in T

lymphocytes in patients with active tuberculosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 59, p. 110–117, jun. 2017.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88–98, 8 fev. 2018.

ZHU, J. et al. The Transcription Factor T-bet Is Induced by Multiple Pathways and Prevents an Endogenous Th2 Cell Program during Th1 Cell Responses. **Immunity**, v. 37, n. 4, p. 660–673, 19 out. 2012.

List of tables

Table 1. Severe obese, Active TB and healthy patient demographic data

	Obesity (BMI > 35 kg/m ²)				p*
	Non-diabetic	Diabetic	Control ^a	Active TB ^a	
	N=22	N=25	N=20	N=21	
Gender (M/F)	3/19	4/21	11/9	18/13	
Age (Years)	40.7 ± 8.8	45.5 ± 9.2	34 ± 14.3	41.5 ± 13.5	
Weight (kg)	113.3 ± 18.5	117.4 ± 18.2	-	-	
BMI (kg/m²)	45 ± 6.4	47.1 ± 7.0	-	-	
Blood glucose (mg/dL)	101.1 ± 25.2	154.4 ± 75.8	94 ± 17	117 ± 32	p=0.0003
Insulin (mg/dL)	20 ± 10.9	20.8 ± 9.6	-	-	
HbA1c (%)	< 6,4 %	> 6,5 %	-	-	
BAAR	NA	NA	NA	21/21 positive	
Culture	NA	NA	NA	16/21 positive	

p* = ANOVA comparison between the four groups. p value is omitted when p<0.05

NA: Not-applicable

Post-test Tukey for glucose serum levels show significant differences between diabetic and non-diabetic obese groups p<0.01, and between diabetic obese and healthy control groups p<0.01.

^a Samples were obtained from the biological sample collection of the Immunopathology and Tropical Diseases Laboratory IPTSP-UFG, protocol of CEP/HC/UFG number 055/2009.

Figure Legends

Figure 1. Median fluorescence intensity (MFI) of CD86 and CD206 molecule expression by CD14⁺⁺CD16, CD14⁺⁺CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes isolated from PBMCs of OB and OBDM patients. A and B: CD86 and CD206 MFI of classical monocytes from healthy control, OB and OBDM individuals. **C and D:** CD86 and CD206 MFI of intermediate monocytes from healthy control, OB and OBDM individuals. **E and F:** CD86 and CD206 MFI of non-classical monocytes from healthy control, OB and OBDM individuals. *p<0.05.

Figure 2. Gating strategy for circulating monocyte analysis and monocyte sub-population percentage from healthy control, OB, OBDM and active TB patients. A: First, singlets were selected, and the monocyte population was gated based on cell size and granularity. Subsequently, the classical, intermediate and non-classical subpopulations of monocytes of control, OB, OBDM and TB individuals were analyzed. **B:** Percentage of classical monocyte population of control, OB, OBDM and TB individuals. **C:** Percentage of intermediate monocyte population of healthy control, OB, OBDM and TB individuals. **D:** Percentage of non-classical monocyte population of control, OB, OBDM and TB individuals, *p<0.05.

Figure 3. CD86 and CD206 expression by classical, intermediate and non-classical monocytes from healthy control, OB, OBDM and active TB patients. A and B: CD86 and CD206 MFIs of classical monocytes from healthy control, OB, OBDM and active TB individuals. **C and D:** CD86 and CD206 MFIs of intermediate monocytes from healthy control, OB, OBDM and active TB individuals. **E and F:** CD86 and CD206 MFIs of non-classical monocytes from healthy control, OB, OBDM and active TB individuals. *p<0.05.

Figure 4. Median fluorescence intensity (MFI) of IL-12p40/23 and IL-6 cytokines in CD14⁺CD16⁺ monocytes from PBMCs, and serum cytokines from OB and active TB patients. A and B: MFI of IL-12p40/23 and IL-6 of non-classical monocytes from healthy, OB, OBDM and active TB patients. **C, D and E:** Adiponectin, TGF- β and TNF- α levels measured in the serum from healthy controls, OB, OBDM and active TB patients *p<0.05.

Figure 5. Median fluorescence intensity (MFI) of TLR-2 and TLR-4 of CD14⁺CD11b⁺ monocyte populations. A: The gating strategy for circulating monocyte analyses started with singlet selection, and the monocyte population was then gated.

Subsequently, analysis of the CD14⁺CD11b⁺ monocyte population was performed. **B:** MFI of TLR-2 of healthy control, OB, OBDM and active TB groups. **C:** MFI of TLR-4 in healthy control, OB, OBDM and active TB groups. *p<0,05.

Figure 6. Mtb (H37Rv) infection of monocytes from healthy controls, OB, OBDM and active TB patients. **A:** Monocytes obtained from healthy individuals, OB, OBDM and active TB patients were infected *in vitro* with Mtb (MOI 1:1). After 24 hours of infection, the cells were lysed with 0.05% Triton. The lysates were diluted to 10⁻¹, 10⁻² and 10⁻³, plated (50 µL) on 7H11 agar medium and incubated for 21 days at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere. **B:** At 24 and 48 hours after infection, the culture supernatants were collected for nitric oxide determination. **C:** After 24 and 48 hours of infection, respectively, the culture supernatants were collected for nitric oxide determination *p<0.05.

Figure 7. Mycobacterium abscessus subsp. massiliense infection of monocytes from healthy controls, OB, OBDM and active TB patients. **A:** Monocytes obtained from healthy, OB, OBDM and active TB patients were infected *in vitro* with *M. abscessus* subsp. *massiliense* (MOI 1:1). After 24 or 48 hours of infection, the cells were lysed with 0,05% Triton. The lysate was diluted to 10⁻¹, 10⁻² and 10⁻³, plated (50 µL) in MH agar medium and incubated for up to 7 days at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere. **B:** CFU growth 24 and 48 hours post-infection. **C:** At 24 and 48 hours after infection, the culture supernatants were collected for nitric oxide determination.

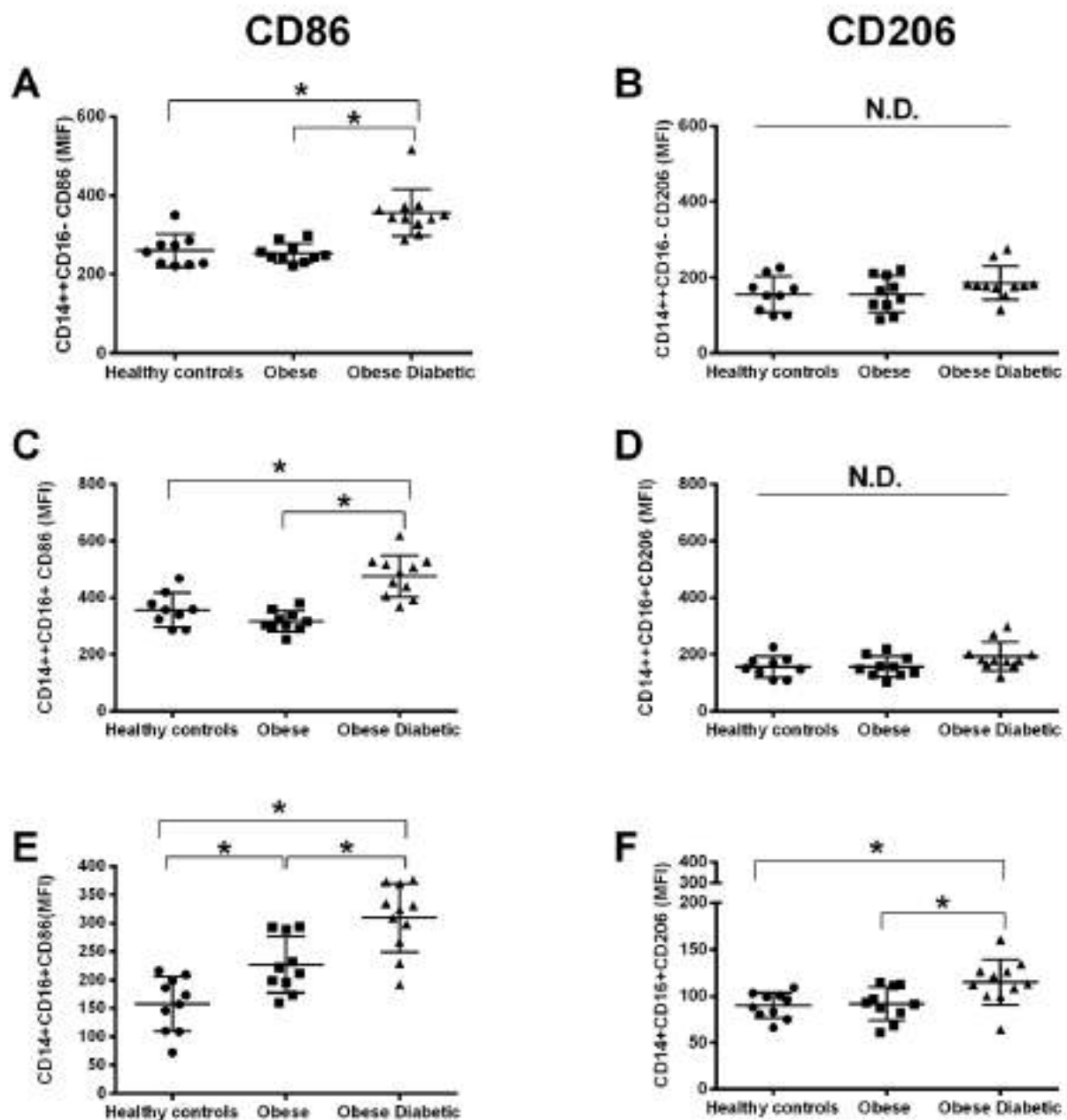


Figure 1. Median fluorescence intensity (MFI) of CD86 and CD206 molecule expression by CD14⁺⁺CD16⁻, CD14⁺⁺CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes isolated from PBMCs of OB and OBDM patients.

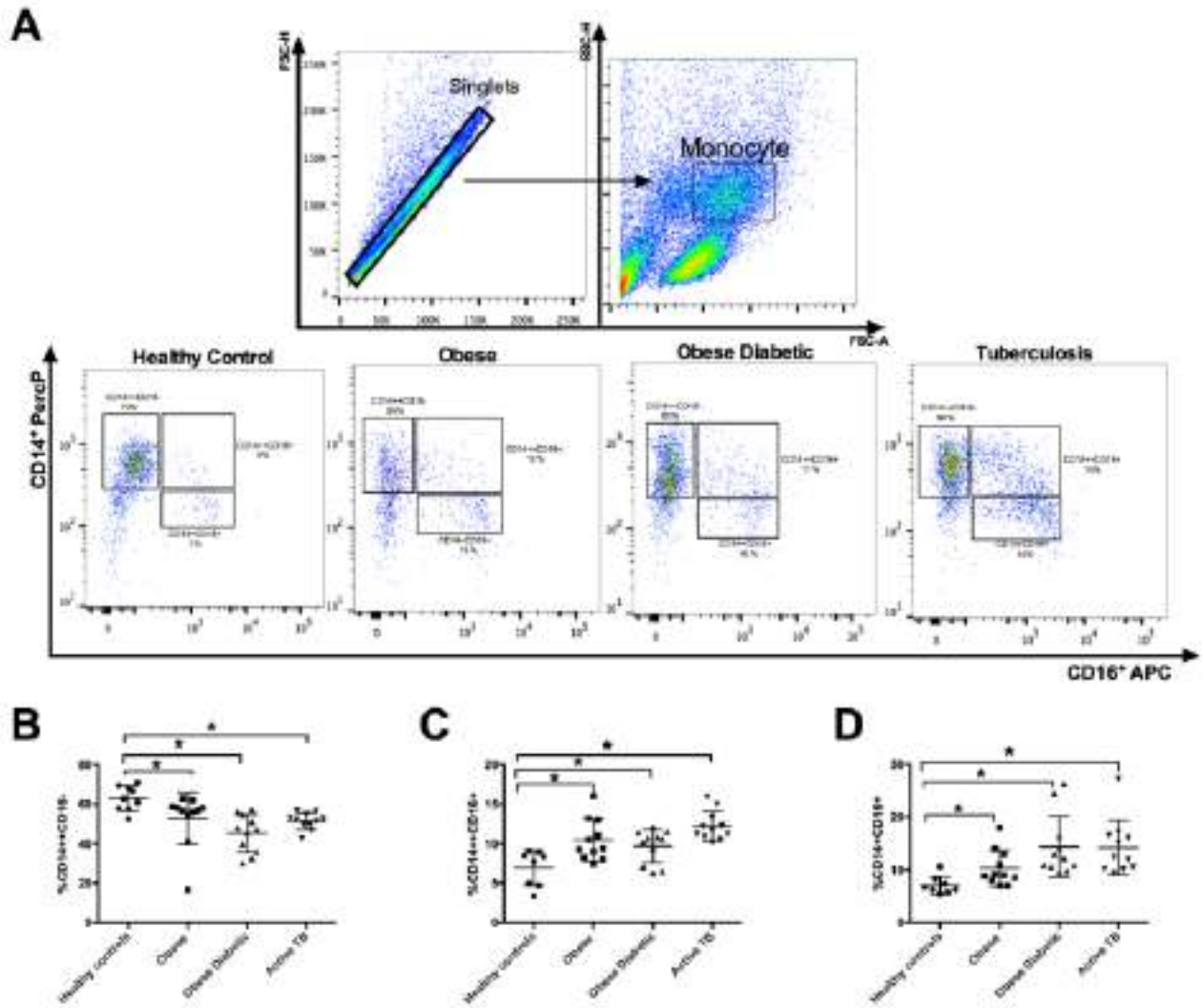


Figure 2. Gating strategy for circulating monocyte analysis and monocyte sub-population percentage from healthy control, OB, OBDM and active TB patients.

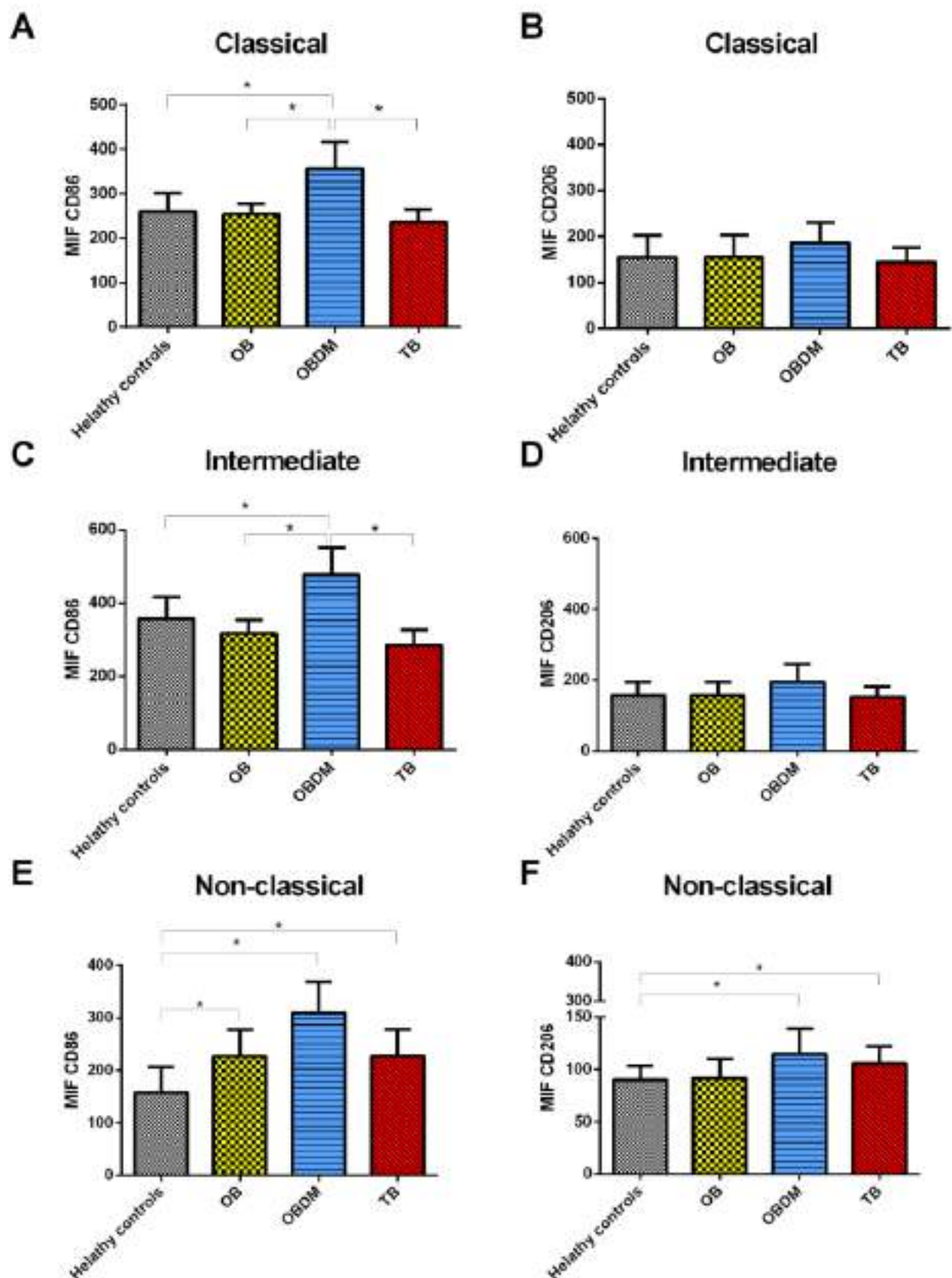


Figure 3. CD86 and CD206 expression by classical, intermediate and non-classical monocytes from healthy control, OB, OBDM and active TB patients.

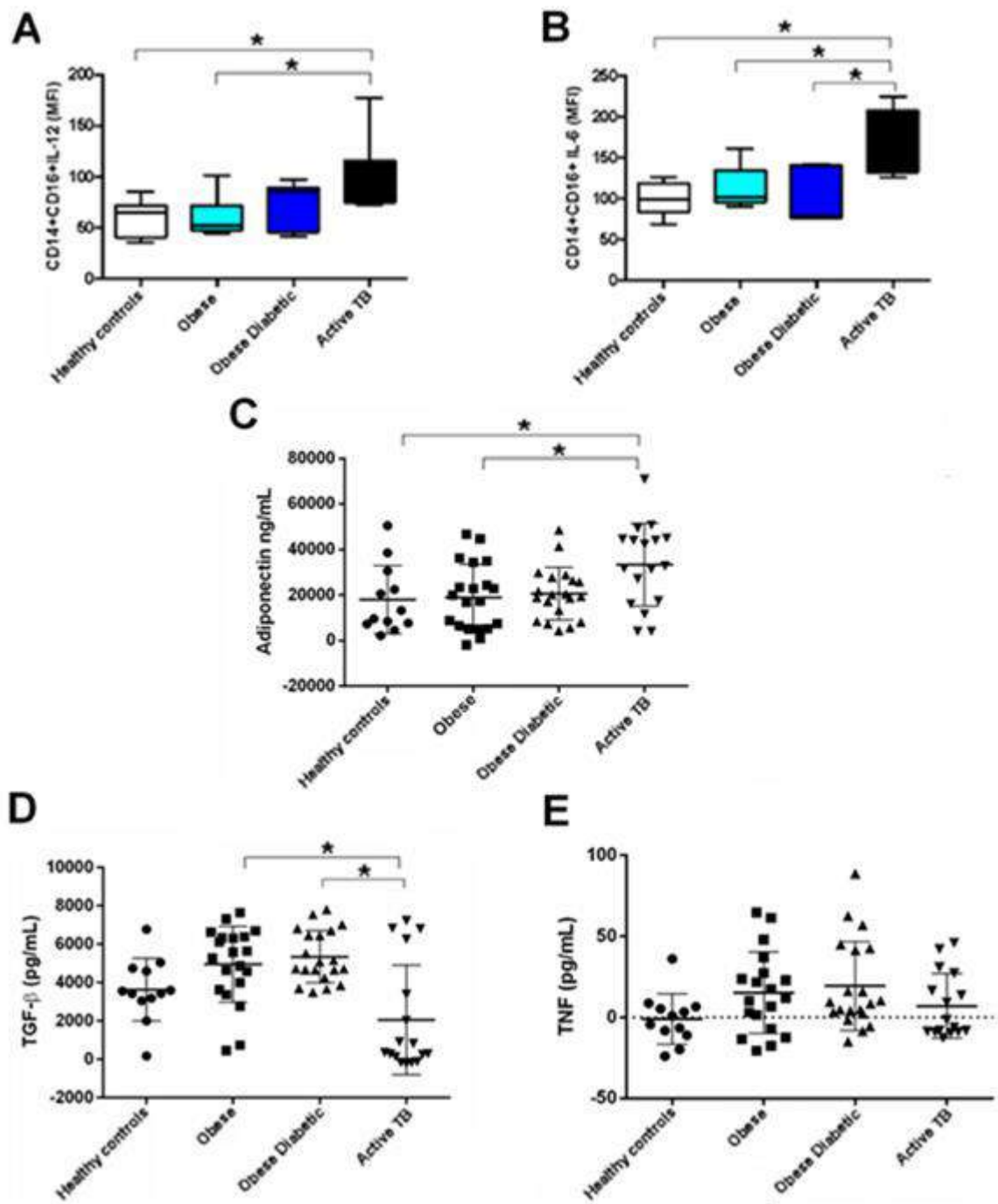


Figure 4. Median fluorescence intensity (MFI) of IL-12p40/23 and IL-6 cytokines in CD14⁺CD16⁺ monocytes from PBMCs, and serum cytokines from OB and active TB patients.

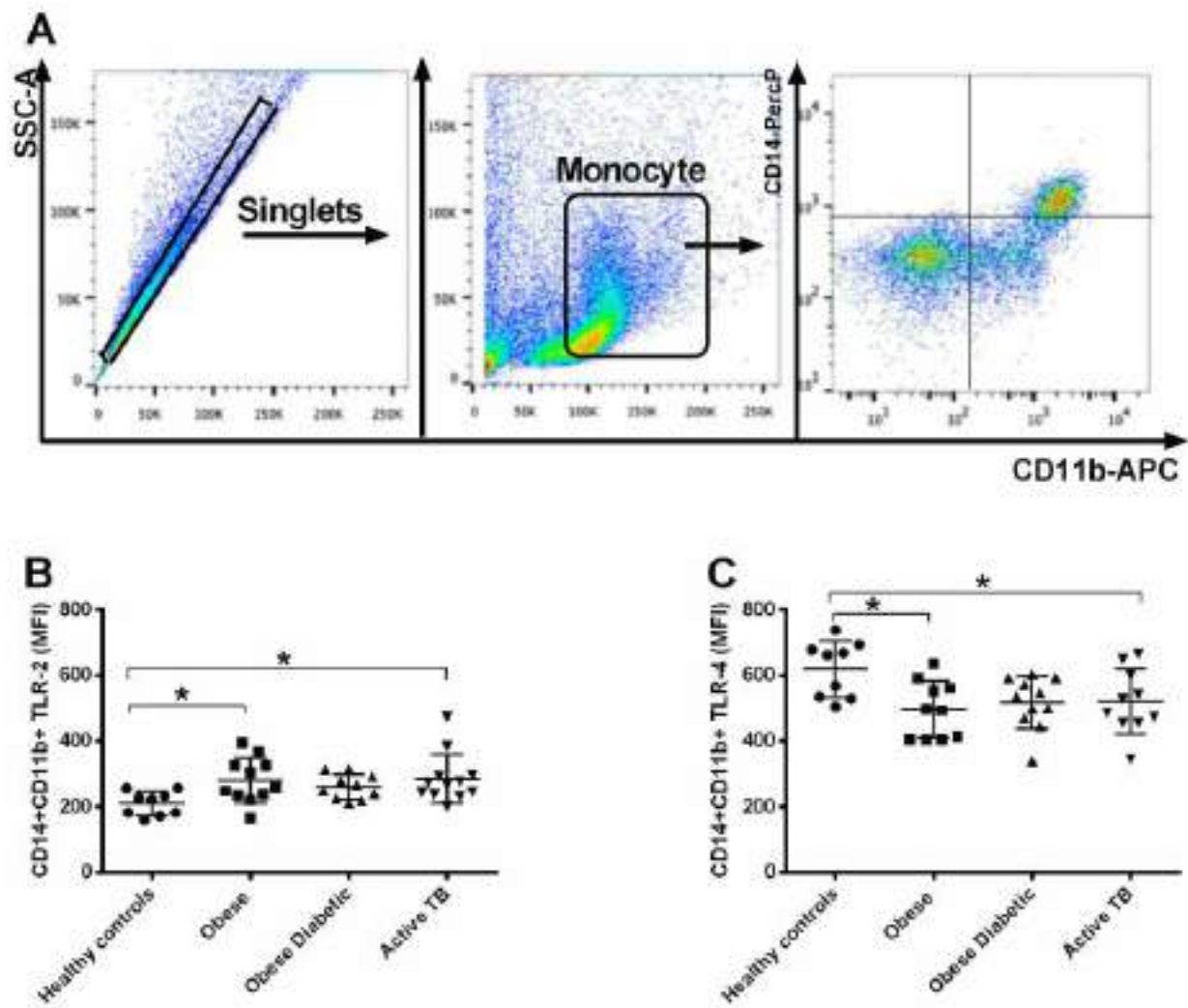


Figure 5. Median fluorescence intensity (MFI) of TLR-2 and TLR-4 of CD14⁺CD11b⁺ monocyte populations.

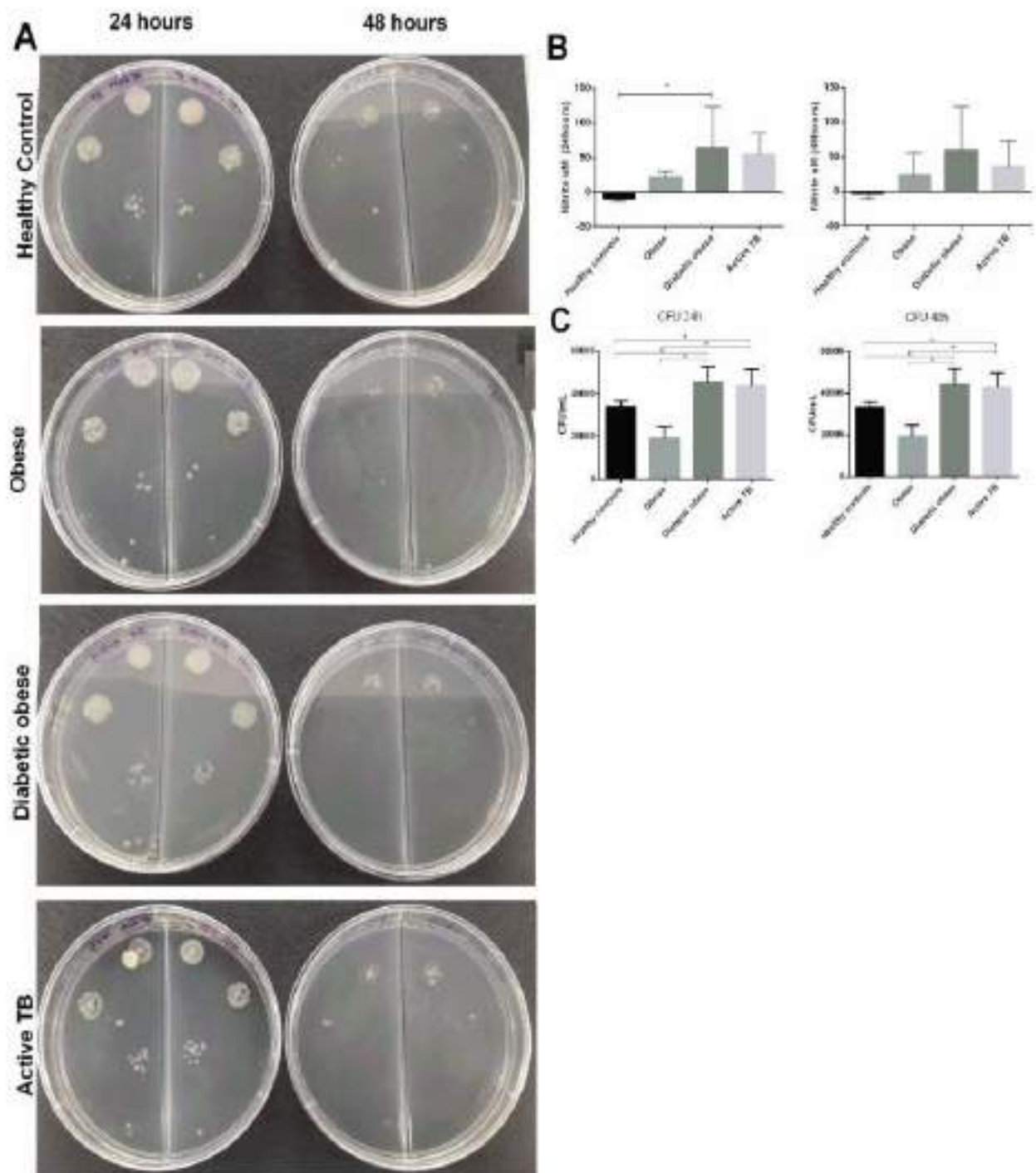


Figure 6. Mtb (H37Rv) infection of monocytes from healthy controls, OB, OBDM and active TB patients.

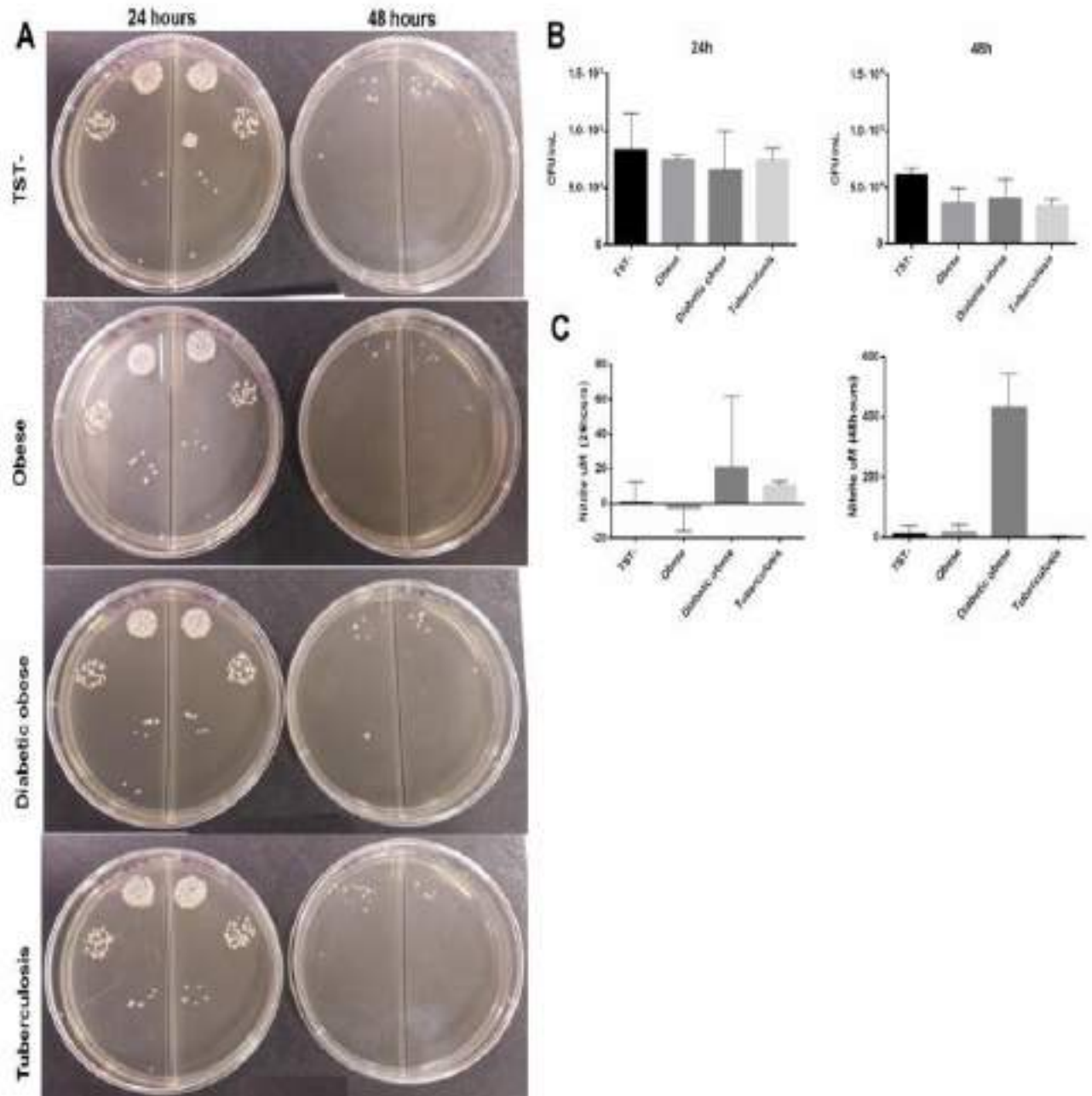


Figure 7. *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* infection of monocytes from healthy controls, OB, OBDM and active TB patients.

1.6. Artigo 2.

Título: Obesidade não interfere no resgate da resposta específica à vacinação com BCG em animais C57BL/6 após desafio com *Mycobacterium tuberculosis*.

Danilo Pires de Resende^a, Camila Oliveira Barbosa Moraes^a, Neila Teixeira Lima^a, Lilia Cristina de Souza Barbosa^a, Mara Rúbia Nunes Celes^c, André Kipnis^b, e Ana Paula Junqueira-Kipnis^a.

^a Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP 74605050.

^b Laboratório de Bacteriologia Molecular, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP 74605050.

^c Laboratório de Histotécnica, Morfometria e Inovação, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Rua 235, setor Universitário, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP 74605050.

Autor Correspondente: Ana Paula Junqueira-Kipnis. Rua 235 esquina com Primeira Avenida, S/N. Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Setor Universitário, Goiânia- Goiás, Brazil. CEP 74605-050. Phone: +55 62 32096174; Fax: +55 62 32096363; E-mail: apkipnis@gmail.com.

Contagem de palavras: 4915

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Geralmente ela afeta os pulmões (TB pulmonar), mas pode também afetar outros órgãos (TB extrapulmonar). A tuberculose continua como um problema de saúde pública, sendo a doença infecciosa mais mortal do mundo (WHO, 2017). Hiperglicemia e insulinopenia celular podem afetar as funções tanto de macrófagos quanto de linfócitos, levando à uma menor capacidade de conter Mtb. Monócitos de pacientes com tuberculose e pacientes com diabetes apresentam fenótipo alterado que pode estar envolvido na maior susceptibilidade de indivíduos diabéticos à tuberculose (RESENDE et al., 2019).

A obesidade é uma doença neurocomportamental, crônica e multifatorial em que o aumento da gordura corporal promove disfunções do tecido adiposo resultando em consequências adversas de base metabólica, bioquímica e psicossocial para a saúde. É diagnosticada pelo Índice de Massa Corporal (IMC), em conjunto com o cálculo do percentual de gordura corporal e circunferência da cintura (WHO, 2018). Além de ser, por si só, um problema de saúde pública mundial, a obesidade é fator de risco para diversas doenças como: diabetes mellitus tipo 2, segunda causa de comorbidade em pacientes com tuberculose (DIBAISE et al., 2008). Estudos recentes mostram que o metabolismo alterado do hospedeiro obeso também afeta as capacidades do sistema imune, pela produção crônica de citocinas pró inflamatórias pelo tecido adiposo hipertrófico, como IL-6, IL1 β , MCP-1, Leptina (JEON; MURRAY, 2008; RESTREPO, 2012; RESTREPO et al., 2011).

Tem sido demonstrado que obesidade/diabetes pode afetar as respostas de vacinas a diversos microrganismos (LIU; GUO; DONG, 2017). Weber e colaboradores (1985), conduziram um estudo para descrever a relação entre resposta vacinal e obesidade. Esse grupo descobriu que, elevado IMC está associado com a falha no desenvolvimento de níveis detectáveis de anticorpos gerados pela vacinação contra Hepatite B em trabalhadores da saúde. Também já foi reportado menor resposta de anticorpos para a mesma vacina em adolescentes com elevado IMC (IMC > 30) (SIMÓ MINÂNA et al., 1996). Para outro agente infeccioso como o vírus da influenza A (H1N1), os indivíduos obesos apresentam resposta à vacina trivalente para influenza (TIV), no entanto, em 12 meses após a vacinação, os títulos de anticorpos se reduzem drasticamente se comparados aos títulos dos indivíduos com IMC < 25 (SHERIDAN et al., 2012).

Devido ao aumento no número de indivíduos portando tanto obesidade quanto diabetes em países endêmicos para tuberculose (DI CESARE et al., 2016 ; LIN et al., 2018), e esses apresentarem mecanismos imunológicos alterados, torna-se crucial avaliar se essas patologias interferem na resposta vacinal à BCG. Adicionalmente, a vacina BCG é utilizada na infância e têm se mostrado o aumento da obesidade infantil (1 em cada 3 crianças apresentam sobrepeso; OMS; 2018), portanto, é crucial avaliar se a obesidade interfere no resgate da resposta imune para a vacina BCG após o desafio com *Mycobacterium tuberculosis*.

Metodologia

Dieta e esquema vacinal

Foram utilizados camundongos machos com 4-6 semanas de idade da linhagem C57BL/6 provenientes do biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, que foram distribuídos ao acaso em grupos de 3 animais, em gaiolas com água e dieta *ad libitum* estéreis, mantidos em ciclo luz/escuro de 12 horas. Os animais dos grupos obesos receberam ração hipercalórica composta de 58% lipídeos, 25,6% carboidratos e 16,4% proteínas, com total calórico de 23,4kJ/g. As condições de temperatura, umidade e ventilação foram mantidas usando estante ventilada em sala com dupla contenção e circulação de ar próprio. As trocas das gaiolas foram realizadas em fluxo laminar classe B2. O uso dos camundongos foi conduzido de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (CONCEA) e aprovado por comitê de ética no uso de animais da UFG Nº 027/14. Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes independentes para comprovação da reprodutibilidade dos experimentos.

Esquema vacinal: os camundongos foram divididos em 6 grupos, sendo eles controle/eutrófico, controle/obeso, vacinação/eutrófico, vacinação/obeso, booster/eutrófico e booster/obeso. Os animais dos grupos vacinação foram inoculados uma única vez no dia 0 com 10^6 UFC de BCG Moreau em 100µL de PBS 0,05% Tween 80, subcutaneamente. Os animais dos grupos Booster receberam inoculação de 10ug de proteína CMX + adjuvante incompleto de Freund + cpgDNA, os animais dos grupos controle receberam apenas PBS 0,05% Tween 80. No fim de 8 semanas, todos os animais

foram desafiados com 10^6 CFU de Mtb via intranasal, após 30 dias foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi realizada a coleta dos órgãos.

Infecção experimental

A cepa H37Rv foi mantida no meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e Tween 80 a 0,05% até a fase de crescimento logarítmico. Alíquotas a -80°C foram armazenadas, e depois de um mês foram plaqueadas em meio de cultura Middlebrook 7H11 suplementado com OADC, e quantificadas. No dia da infecção, o inóculo foi diluído em PBS-Tween 80 a 0.05%, na concentração indicada (10^6 UFC/mL). Os animais foram infectados por via intranasal com 100uL de suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv à 10^6 UFC/mL, contendo assim 10^5 UFC/animal. Após a infecção, sob o nível de biossegurança três (BL3), os animais foram mantidos em microisoladores acoplados a rack ventilada equipada com filtros absolutos HEPA na entrada e saída de ar.

Histopatologia

Foram separados para avaliação histológica o lóbulo caudal direito do pulmão dos animais desafiados com Mtb após 30 dias ($n=3$ /grupo). Os pulmões foram perfundidos com heparina 0,05% através da inoculação no ventrículo direito do coração. O lóbulo pulmonar foi fixado em paraformaldeído tamponado a 10%. Os tecidos foram processados posteriormente e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise microscópica (Axio scope.A1 – Carl Zeiss).

Citometria de fluxo

Os lobos pulmonares anterior e posterior esquerdos e o baço dos animais eutanasiados aos 30 dias após o desafio com Mtb (H37Rv) foram coletados ($N = 3$). O pulmão foi fragmentado e incubado com Dnase/Colagenase 10% por 30 minutos a 37°C e posteriormente as células foram separadas em peneira de nylon de $70\mu\text{m}$. As células do baço foram obtidas por passagem em peneira de nylon de $70\mu\text{m}$. As hemácias foram lisadas com tampão de lise (0,15M NH_4Cl , 10mM KHCO_3) e as células remanescentes foram ajustadas para 1×10^6 células/mL. Foram plaqueados os diferentes estímulos na placa de 96 poços antes da adição das suspensões celulares do pulmão e baço. Os esplenócitos e células pulmonares foram estimuladas com ConA (10 $\mu\text{g/mL}$) ou derivado

proteico de cultura de BCG (10 µg/mL) mais anti-CD3 (Clone 17A2 Biolegend) e anti-CD28 (Clone 17.51 Biolegend), ou não estimulados (meio). Depois de incubar em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 4 h, uma solução de Monenzina (3 µM; BD Pharmingen) foi adicionada às células, e novamente incubadas por 6 horas. Para a marcação de linfócitos, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4+PercP (Clone RM4-5 eBioscience) e anti-CD8-PE (CLONE 53-6.7 eBioscience) por 20 minutos. A marcação intracelular foi feita usando anti-IFN-γ-APC (clone: XMG1.2 eBioscience) diluído em tampão Perm Wash (BD Cytotfix/Cytoperm Kit). Para avaliar macrófagos, monócitos, granulócitos e células dendríticas, as células foram marcadas com anti-F4/80-APC (Clone BM8 Biolegend), anti-CD11b-FITC (M1-70 eBioscience) e anti-CD11c-PE (Clone 1418 eBioscience). As células foram adquiridas com o citômetro de fluxo BD Biosciences FACSVerse (Laboratório Multiusuário de cultura de células – Escola de Veterinária e Zootecnia- UFG) e os dados foram analisados usando o software FlowJo 8,7.

Análise estatística

Os resultados foram tabulados, e o número total de células foi calculado utilizando programa Microsoft Office Excell 2013. Os dados foram transferidos para programa GraphPad Prism vr.7, onde foram calculados a média e o desvio padrão das amostras. Foi realizada a análise de variância entre os grupos (two-way ANOVA) seguido de pós-teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferença estatística foi considerada quando valor de $p < 0,05$.

Resultados

1. Dieta hiperlipídica induz ganho de peso e aumento da glicose circulante em camundongos C57BL6 mesmo após infecção com Mtb.

Os animais foram vacinados no início do esquema para reproduzir a vacinação em humanos que ocorre antes do desenvolvimento da obesidade (Figura 1A). A dieta hiperlipídica foi iniciada no dia da vacinação e mantida até o final do esquema. Pode-se observar que os animais sob dieta hiperlipídica apresentaram ganho de peso (Figura 1C) a partir da quarta semana (Figura 1B), com um ganho de peso percentual ao final do esquema por volta de 60% contra 15% do aumento no peso dos animais sob dieta

convencional (Figura 1D). Também foi observado aumento nos níveis de glicose sérica ao final do delineamento experimental nos animais sob dieta hiperlipídica, compatíveis com níveis associando à diabetes (Figura 1E) (SURWIT et al., 1988).

2. A formação de resposta vacinal em camundongos obesos parece ser prejudicada quando a vacinação ocorre antes do estabelecimento da obesidade.

Para a avaliação da resposta vacinal, foi pesquisada as células TCD4 e TCD8 específicas produtoras de IFN γ presentes no baço dos animais. Observamos que de modo geral, os animais obesos apresentam uma quantidade menor de células TCD4⁺ no baço (Figura 2A) quando infectados com *M. tuberculosis*. Dentre essas células, um número significativamente menor, quando comparado aos animais eutróficos, são capazes de produzir IFN- γ após estímulo com antígenos de BCG (Figura 2B). Quanto às células TCD8, observamos que não houve diferença estatística no número total dessas células no baço de ambos os animais eutróficos e obesos (Figura 2C), nem na quantidade de células TCD8 produtoras de IFN- γ (Figura 2D).

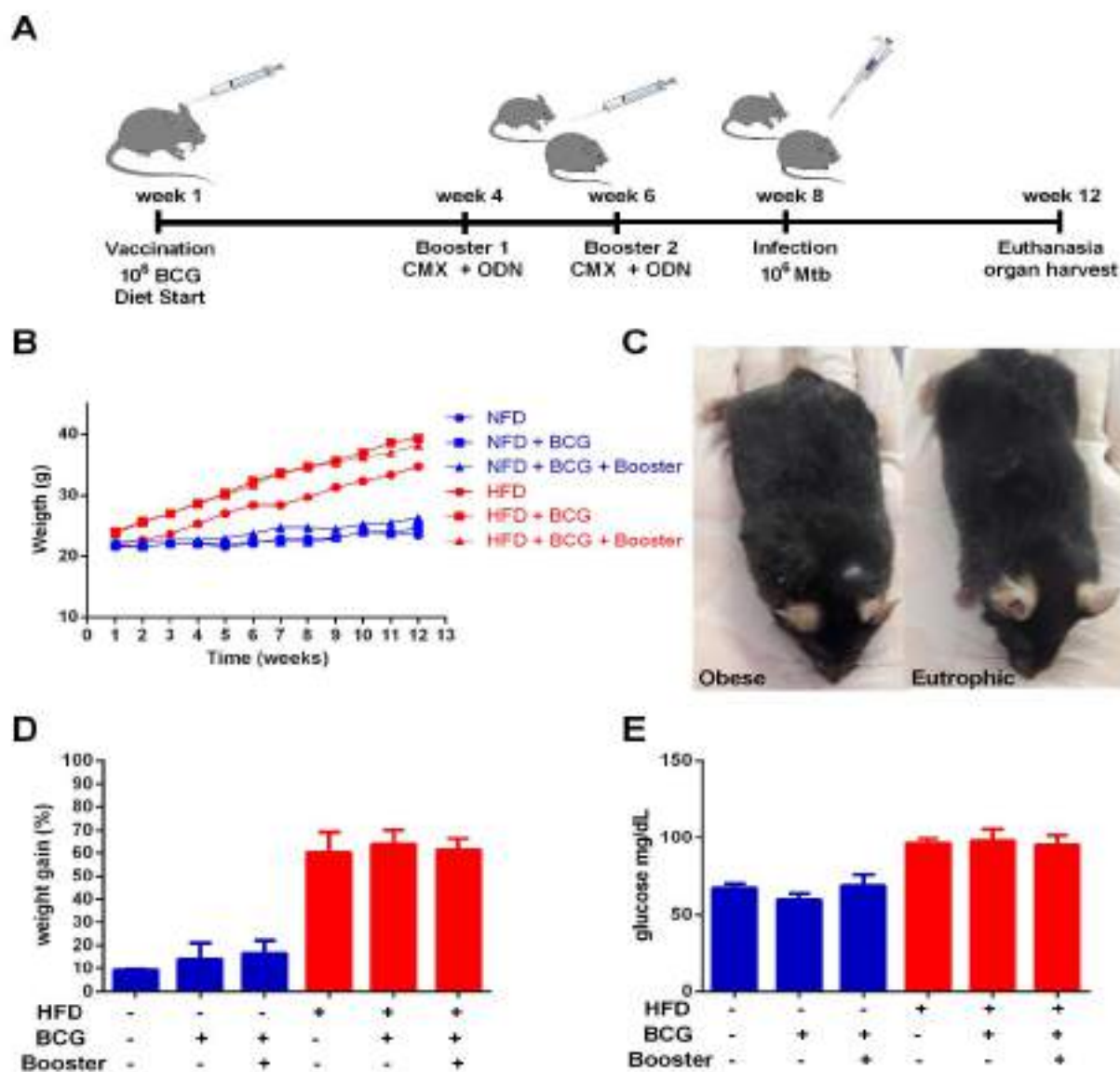


Figura 1. Ganho de peso e aumento de glicose sanguínea pós dieta hipercalórica de 12 semanas. Linha do tempo representativa do esquema de dieta e vacinação de camundongos C57BL/6 machos (A); Cinética de ganho de peso semanal de camundongos C57BL/6 sob dieta hiperlipídica ou não (B); Imagem representativa de animal obeso e animal eutrófico (C); Ganho de peso percentual de camundongos C57BL/6 sob dieta hiperlipídica ou não, porcentagem calculada pelo peso ao final do esquema em comparação com peso inicial (D); Níveis de glicose sérica de camundongos C57BL/6 sob dieta hiperlipídica ou não ao final do esquema vacinal, dosagem realizada após 12 horas de jejum (E). NFD – Normal Fat Diet, HFD – High Fat Diet.

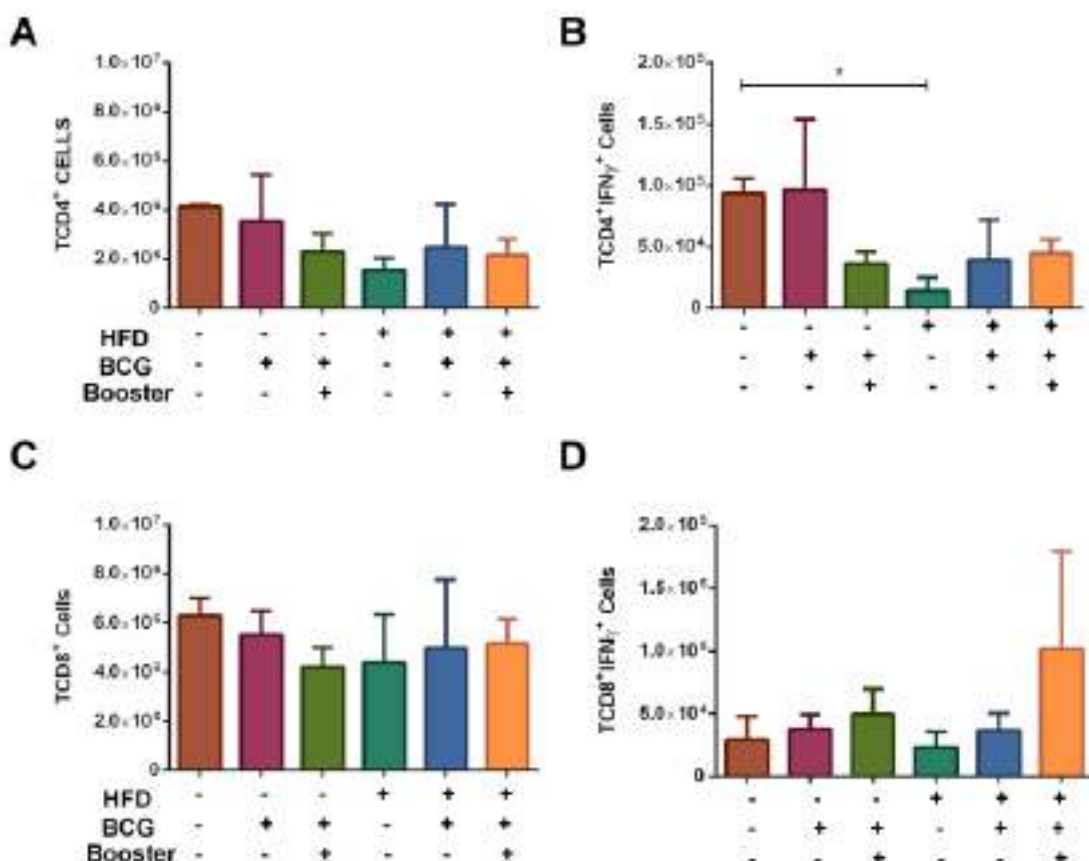


Figura 2. Células TCD4 e TCD8 específicas produtoras de IFN γ no baço dos animais infectados. Os animais foram vacinados ou não e submetidos a diferentes dietas : Hiperlipídica (HFD) ou dieta convencional (NFD), e 30 dias após a última vacinação foram desafiados com Mtb. Os linfócitos do baço foram avaliados após 30 dias do desafio. (A e B), Número absoluto de linfócitos TCD4⁺ no baço de animais obesos (HFD) ou normais (NFD) após vacinação com BCG ou BCG + booster e desafio com Mtb. Em (B), TCD4⁺IFN γ ⁺. (C e D), Número absoluto de linfócitos TCD8⁺ no baço de animais obesos (HFD) ou normais (NFD) após vacinação com BCG ou BCG + booster e desafio com Mtb. Em (D), TCD8⁺IFN γ ⁺. * = p < 0,05.

3. Camundongos obesos apresentam maior lesão pulmonar pós infecção.

Para avaliar a extensão da lesão pulmonar causada pela infecção com Mtb, foi realizada a avaliação histopatológica do lobo caudal inferior do pulmão dos animais. Por meio da contagem da área com presença de infiltrado inflamatório e/ou perda da

arquitetura pulmonar, foi estabelecido um *score* de área lesionada de cada órgão. Pode-se observar que nos animais eutróficos a vacinação com BCG diminuiu a área lesionada no pulmão, enquanto a vacinação com booster provocou aumento da área lesionada. Já nos animais obesos há grande presença de área lesionada nos animais não vacinados, a vacinação com BCG e BCG mais Booster com CMX conseguem reduzir a área lesionada (Figura 3). Esses resultados sugerem que a obesidade/diabetes está relacionada com maior lesão causada pela resposta inflamatória no pulmão após infecção com Mtb, e apesar de vacinação com BCG conseguir diminuir a área lesionada, está ainda é superior à de animais não obesos.

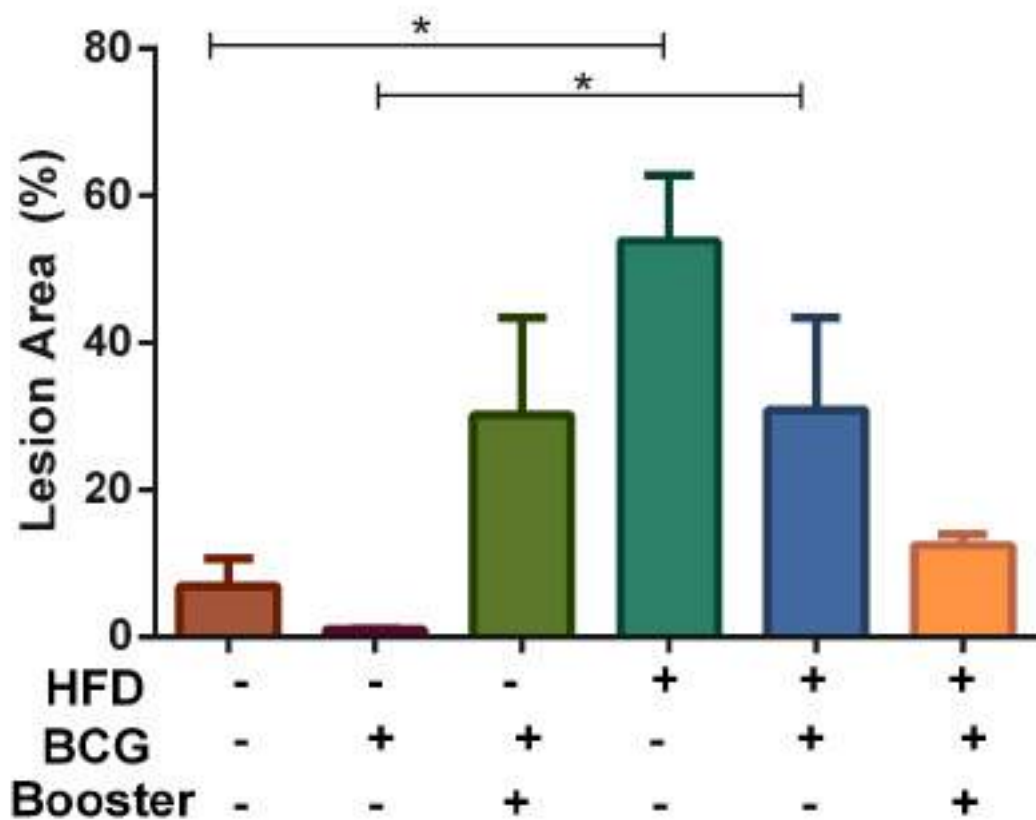


Figura 3. Porcentagem de área lesionada no pulmão dos animais. Porcentagem de área lesionada, avaliada por microscopia de luz, relativa à área total de no mínimo três campos representativos do pulmão de cada animal, sob dieta hiperlipídica ou não, vacinados com BCG ou BCG mais booster com CMX, após infecção com Mtb. HFD – Grupo sob dieta hiperlipídica, BCG – Grupo vacinado com BCG Moreau, Booster – Grupo vacinado com BCG Moreau seguido de dois boosters de proteína recombinante CMX.

Ao avaliar as fotomicrografias representativas de cada tratamento (Figura 6), pode-se observar o intenso infiltrado inflamatório no pulmão dos animais obesos (Figura 4D), e obesos vacinados com BCG (Figura 4E). Os animais eutróficos apresentam pouco infiltrado inflamatório e arquitetura dos alvéolos pulmonares preservada (Figura 4A e 4B), exceto pelos animais vacinados com BCG + booster com CMX (Figura 4C). O infiltrado celular aparenta ser de natureza mononuclear em todos os animais estudados.

4. Recrutamento de células da imunidade inata para pulmão de camundongos após infecção com Mtb parece ser reduzida na obesidade.

Uma importante característica da vacina BCG é a ativação da imunidade inata que posteriormente direciona o desenvolvimento da resposta adaptativa (NETEA ; VAN CREVEL, 2014). Após infecção, tais células estimuladas pela vacina migram para o local da infecção para exercer sua função. Quando avaliado o número total de células dendríticas, monócitos, granulócitos além dos macrófagos alveolares residentes, não foi observada diferença significativa entre os animais obesos e normais (Figura 5), houve redução da população de granulócitos nos animais obesos sem tratamento em relação aos animais eutróficos sem tratamento (Figura 5C).

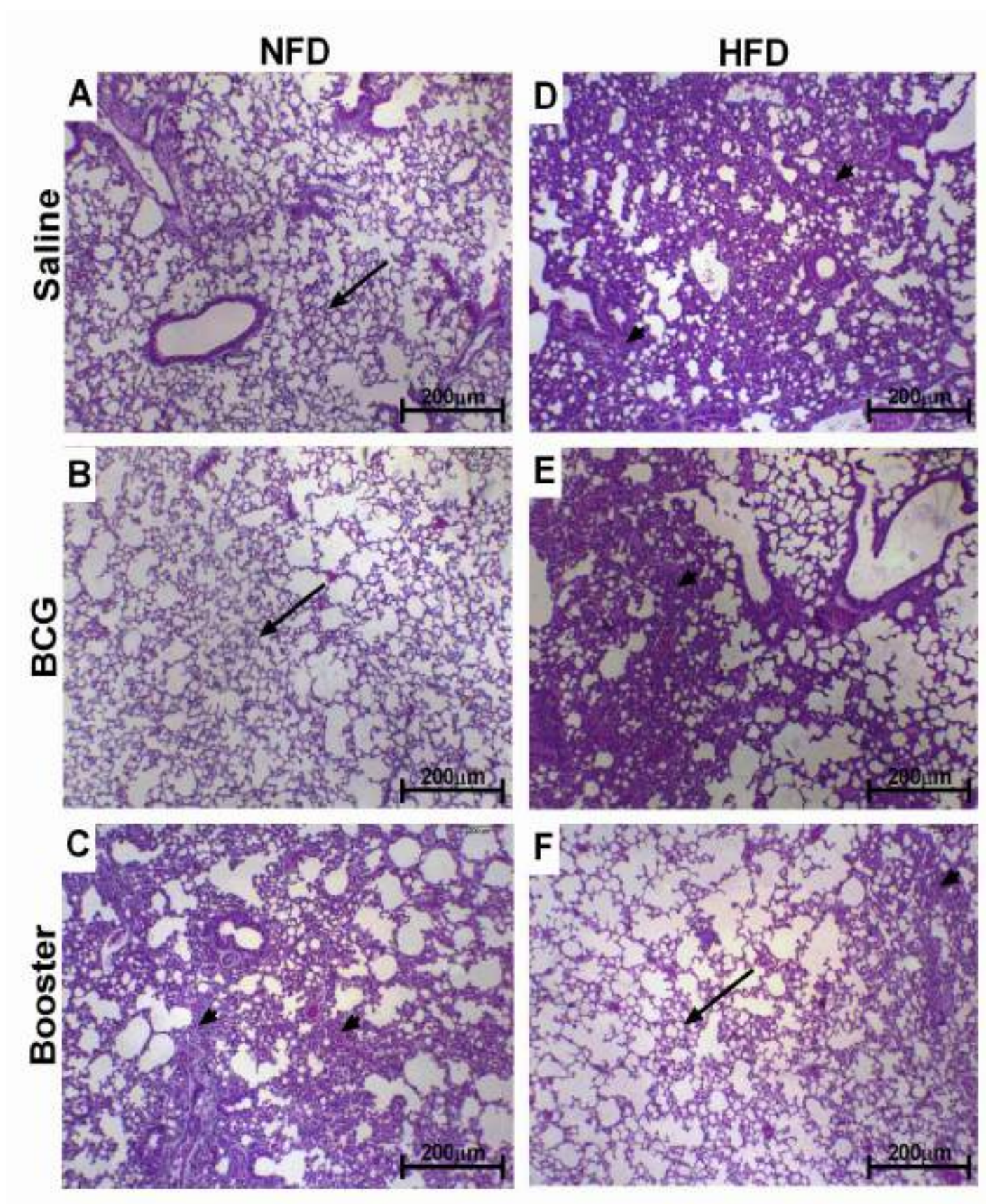


Figura 4. Análise histopatológica do pulmão de camundongos C57BL/6 sob dieta hiperlipídica após infecção com *Mtb*. Foi coletado o lobo caudal direito do pulmão de camundongos sob dieta hiperlipídica ou convencional, vacinados com BCG ou BCG mais

booster com CMX, 30 dias após infecção com Mtb. Foram confeccionadas lâminas histológicas de cada órgão e obtidas fotomicrografias representativas de cada corte. Coloração HE, Aumento 4x. (A) - camundongo C57BL/6 sob dieta convencional, (B) - camundongo C57BL/6 sob dieta convencional vacinado com BCG, (C) - camundongo C57BL/6 sob dieta convencional vacinado com BCG mais booster com CMX, (D) - camundongo C57BL/6 sob dieta hiperlipídica, (E) - camundongo C57BL/6 sob dieta hiperlipídica vacinado com BCG, (F) - camundongo C57BL/6 sob dieta hiperlipídica vacinado com BCG mais booster com CMX. Seta longa – tecido com arquitetura preservada ; Seta curta – infiltrado inflamatório.

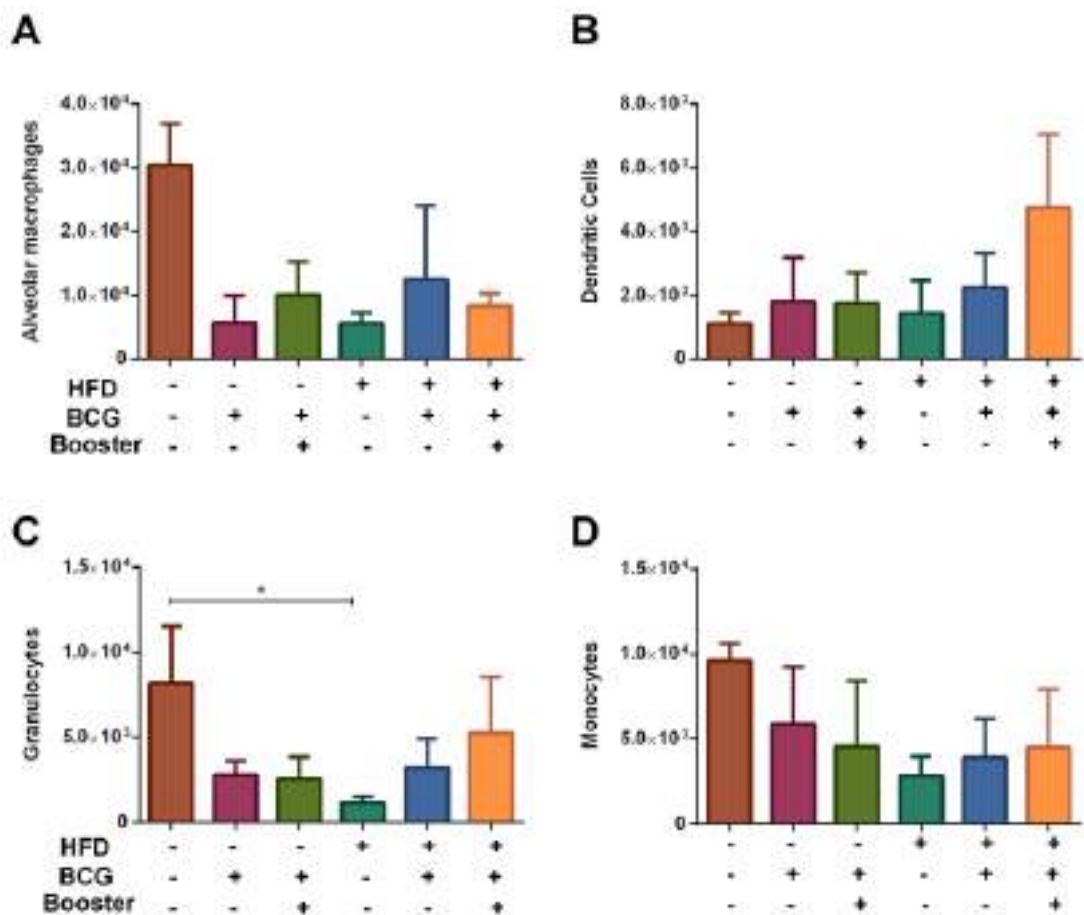


Figura 5. Recrutamento de células inatas para pulmão de animais C57BL/6 sob dieta hiperlipídica ou não após infecção por Mtb. Os animais foram vacinados ou não e submetidos a diferentes dietas : Hiperlipídica (HFD) ou dieta convencional (NFD), e 30 dias após a última vacinação foram desafiados com Mtb. As células da resposta inata

foram avaliadas no pulmão 30 dias após o desafio, de acordo com a expressão das moléculas CD11b e CD11c. (A) Contagem absoluta de macrófagos alveolares F4/80⁺CD11b⁻CD11c^{HIGH}, (B); Contagem absoluta de células dendríticas F4/80⁺CD11b^{HIGH}CD11c^{HIGH}, (C); Contagem absoluta de granulócitos F4/80⁺CD11b^{MID}CD11c⁻, (D); Contagem absoluta de monócitos F4/80⁺CD11b^{MID}CD11c^{MID}. * = p < 0,05.

Para melhor avaliar o recrutamento dessas populações celulares para o pulmão dos animais após a infecção, foi realizado a avaliação de cada população celular em proporção às demais dentro de cada grupo experimental. Pode-se observar que a proporção de macrófagos alveolares está aumentada após a infecção nos camundongos eutróficos controles, enquanto nos animais vacinados, as proporções dessas células diminuem, aumentando a proporção de células dendríticas e monócitos. Independente do desafio com Mtb, animais eutróficos mantiveram a proporção de granulócitos constante.

Nos animais obesos há uma predominância dos macrófagos alveolares, que se mantêm mesmo após a vacinação com BCG (Figura 6B, 6D). Apenas o grupo que recebeu dois reforços com proteína recombinante CMX foi capaz de recrutar outras populações celulares para o tecido pulmonar (Figura 6F), como células dendríticas e monócitos. Esses resultados sugerem que a obesidade prejudica o recrutamento de células da imunidade inata para o órgão alvo após a infecção por Mtb, o que pode prejudicar a formação da subsequente resposta de células T.

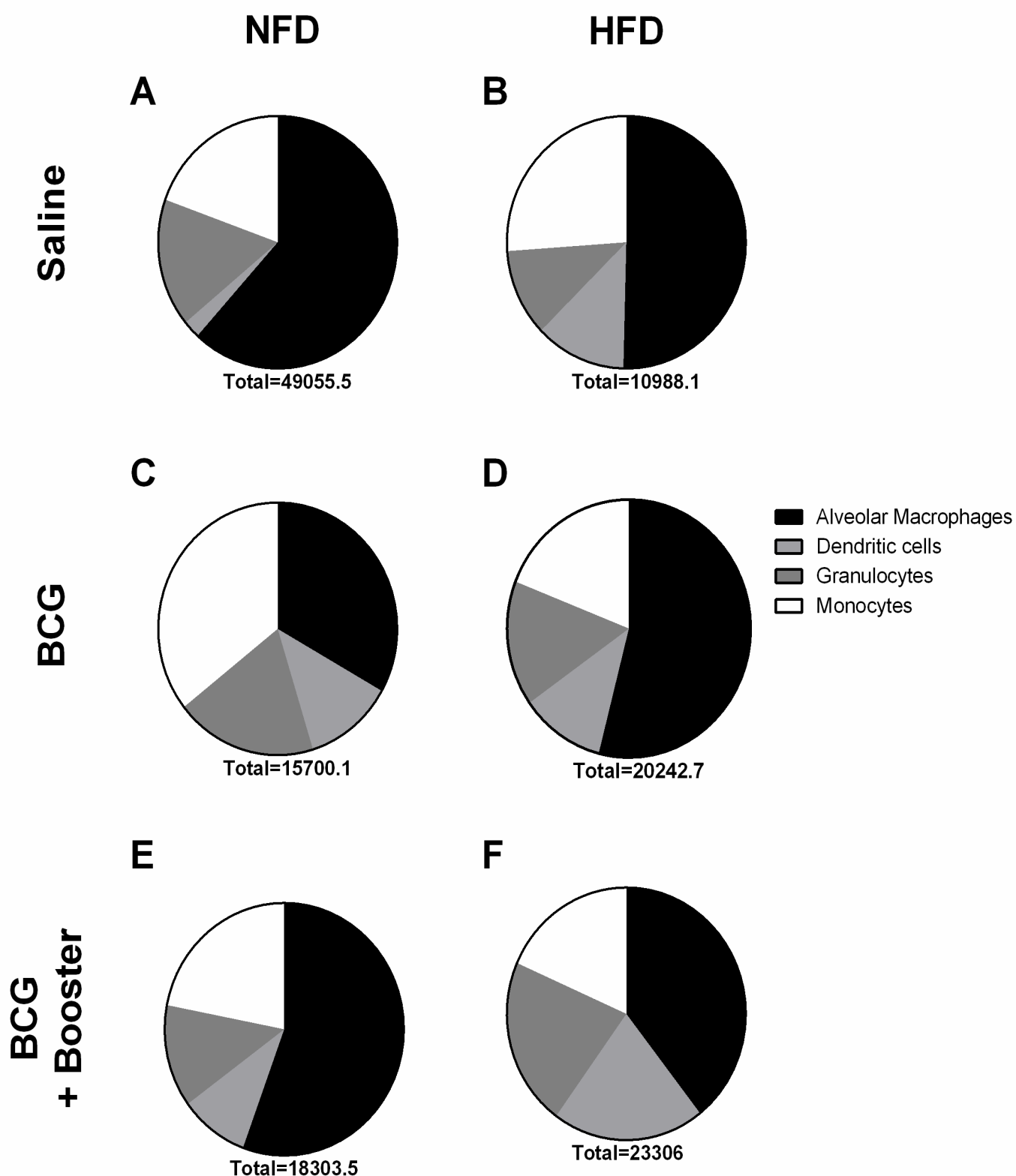


Figura 6. Amplitude do recrutamento de células inatas para o pulmão dos animais C57BL/6 sob dieta hiperlipídica ou não após infecção por Mtb. Os animais foram vacinados ou não e submetidos a diferentes dietas : Hiperlipídica (HFD) ou dieta convencional (NFD), e 30 dias após a última vacinação foram desafiados com Mtb. As

células da resposta inata foram avaliadas no pulmão após dias do desafio, a proporção de cada população celular foi avaliada dentro de cada grupo. (A) – Proporção das populações celulares em animais C57BL/6 após infecção com Mtb ; (B) - Proporção das populações celulares em animais C57BL/6 sob dieta hiperlipídica após infecção com Mtb; (C) - Proporção das populações celulares em animais C57BL/6 vacinados com BCG após infecção com Mtb ; (D) - Proporção das populações celulares em animais C57BL/6 sob dieta hiperlipídica vacinados com BCG após infecção com Mtb ; (E) - Proporção das populações celulares em animais C57BL/6 vacinados com BCG mais booster com CMX, após infecção com Mtb ; (F) - Proporção das populações celulares em animais C57BL/6 sob dieta hiperlipídica vacinados com BCG mais booster com CMX, após infecção com Mtb.

Discussão

As alterações metabólicas causadas pela obesidade/diabetes podem interferir na resposta vacinal protetora à diversos patógenos (LIU; GUO; DONG, 2017a; NEIDICH et al., 2017; SHERIDAN et al., 2012; SIMÓ MIÑANA et al., 1996), porém ainda não foi demonstrado se a obesidade afeta a resposta imune para a vacina BCG. Neste trabalho a obesidade induzida após a vacinação com BCG parece não interferir diretamente no resgate de linfócitos TCD4⁺IFN γ ⁺ após o desafio com *M. tuberculosis*. Além disso, o tecido pulmonar dos animais obesos apresenta maior lesão quando comparados aos animais eutróficos. Também pode-se observar que parece haver menor recrutamento de células inatas para o pulmão dos camundongos obesos, com predominância de macrófagos alveolares residentes.

Para indução da obesidade, os animais foram submetidos a uma dieta hipercalórica de 8 semanas (Figura 1A). Este método de obesidade experimental foi escolhido por ser o que melhor representa a obesidade humana (LUTZ; WOODS, 2012), em relação às alterações metabólicas e ao acúmulo de lipídio, além do desenvolvimento de altos níveis de glicose séricos.

Para a avaliação da resposta vacinal à BCG frente a infecção foi pesquisado as células TCD4 e TCD8, pois estudos já demonstraram que células TCD4 são as principais células efectoras geradas por BCG no pulmão, e demonstram a importância das células TCD8 em prevenir a disseminação (KIPNIS et al., 2005; YAO et al., 2014). Foi observado que parece haver redução de células TCD4⁺IFN γ ⁺ nos animais obesos, independente de qual tratamento realizado (Figura 2B), sugerindo que as alterações metabólicas presentes na obesidade/diabetes podem interferir na ativação da resposta vacinal da BCG, reforçando a associação entre as epidemias de diabetes e tuberculose (KAPUR et al., 2016). Não houve alteração nas células TCD8 (Figura 2C, 2D), o que não é surpreendente visto que estudos já demonstraram que a obesidade não influencia o desenvolvimento ou a manutenção de respostas de células TCD8 de memória formadas tanto antes quanto depois do estabelecimento da obesidade perante infecção com patógenos diferentes (KHAN et al., 2014).

Estudos anteriores com vacina BCG e com a proteína CMX mostram que além de induzir resposta celular específica, a BCG é capaz de proteger o tecido pulmonar de danos causados pelo processo inflamatório gerado durante a infecção por Mtb (DA COSTA et al., 2014). Neste estudo, enquanto a área lesionada no pulmão de animais eutróficos é diminuída pela vacinação com BCG em níveis semelhantes à estudos anteriores (DA COSTA et al., 2014); os animais obesos apresentam porcentagem de área lesionada superior (Figuras 3 e 4). A obesidade já é associada com lesão pulmonar em diversas enfermidades infecciosas ou não (MCCALLISTER et al., 2009); estudos mostram que a diminuição de adiponectina característica da obesidade causa o aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais do pulmão de camundongos obesos, além de reduzir a expressão de moléculas juncionais entre essas células, resultando em maior dano ao tecido pulmonar frente desafio com LPS (SHAH et al., 2015). Desse modo, a maior predisposição à lesão no tecido pulmonar causada pela obesidade pode ser responsável pela grande porcentagem de área lesionada, mesmo após vacinação com BCG, encontrada em animais obesos neste trabalho (Figura 3 e 4), apesar do menor recrutamento de células inatas também evidenciado aqui (Figura 5).

Para determinar a natureza do infiltrado celular inflamatório evidenciado no tecido pulmonar (Figura 4), as células da imunidade inata presentes no pulmão dos animais infectados foram analisadas por citometria de fluxo. Quando comparamos cada população

celular com as demais em um mesmo grupo, observamos que os animais obesos permanecem com maioria de macrófagos alveolares no parênquima pulmonar mesmo após a vacinação com BCG (Figura 5B, 5D), enquanto os animais eutróficos recrutam mais células dendríticas e monócitos para o órgão após a vacinação. Somente os animais que foram desafiados com CMX apresentam recrutamento de células similar aos animais eutróficos (Figura 5E). Como visto anteriormente, a interação da proteína CMX com macrófagos ativa NF- κ B, e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (DA COSTA et al., 2017), o que poderia recuperar o recrutamento de células dos indivíduos obesos quando recebem reforço com CMX. A diminuição da área lesionada em animais obesos vacinados que receberam reforço sugere que a obesidade possa interferir na formação de resposta inflamatória específica para CMX. Quanto à menor migração de células nos animais obesos/diabéticos, vários estudos mostram que a diabetes altera vias relacionadas com a migração de células imunes como a diminuição da interação entre leucócitos e o endotélio (ANJOS-VALOTTA et al., 2006), menor resposta vascular à mediadores imunes como a histamina e bradicinina (FORTES; LEME; SCIVOLETTO, 1984), além de menor resposta das vias aéreas à exposição à antígeno (BELMONTE; FRYER; COSTELLO, 1998); desse modo, o estado diabético causado pela obesidade pode estar contribuindo para uma menor migração de células inatas para os animais obesos neste estudo.

Esses dados sugerem que o estado metabólico alterado na obesidade/diabetes já estabelecida, não influencia na formação de resposta vacinal em um curto período de tempo. Uma particularidade da vacina BCG é a indução de imunidade treinada em células inatas, principalmente macrófagos (ARTS et al., 2018). Tal fenômeno é caracterizado pela habilidade melhorada dos macrófagos em produzir citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, sendo mediado por modificações epigenéticas e sinalização de NOD2 (MOURITS et al., 2018). Talvez o fenômeno observado neste trabalho possa ser devido à perda de macrófagos treinados por BCG devido à prolongada exposição ao ambiente de obesidade/diabetes, visto que essas células sofrem mudanças drásticas em seu metabolismo energético (Warburg effect) (MOURITS et al., 2018) que talvez seja prejudicado pela obesidade/diabetes. Uma diminuição nessas células contribuiria para a menor resposta de células TCD4+IFN γ + (Figura 2).

Em suma os resultados aqui apresentados sugerem que a obesidade/diabetes, desenvolvida ao longo da vida, pode prejudicar a ativação de resposta vacinal à BCG frente infecção de Mtb; indicando o envolvimento da obesidade no resgate da resposta vacinal. Como a vacina BCG é, em sua maioria, administrada ao nascer, a interferência na formação de resposta causada pela crescente epidemia de obesidade infantil se torna mais um desafio para as metas da Organização Mundial de Saúde para a erradicação da TB até 2050.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório multiusuário de cultura de células - Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG para uso de citômetro de fluxo. A Dra. Gisleine Fernanda França, do laboratório de histotécnica, morfometria e inovação, pela confecção e coloração das lâminas histológicas. Este trabalho faz parte da tese de doutorado do DPR no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da CAPES, com apoio financeiro do CNPq.

Referências

- ANJOS-VALOTTA, E. A. et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. *Inflammation Research*, v. 55, n. 1, p. 16–22, 23 jan. 2006.
- ARTS, R. J. W. et al. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host & Microbe*, v. 23, n. 1, p. 89–100.e5, 10 jan. 2018.
- BELMONTE, K. E.; FRYER, A. D.; COSTELLO, R. W. Role of insulin in antigen-induced airway eosinophilia and neuronal M 2 muscarinic receptor dysfunction. *Journal of Applied Physiology*, v. 85, n. 5, p. 1708–1718, nov. 1998.
- CHAPMAN, N. M.; CHI, H. Dietary Fat Inflames CD4 + T Cell Memory in Obesity. *Cell Metabolism*, v. 25, n. 3, p. 490–492, 7 mar. 2017.
- DA COSTA, A. C. et al. A new recombinant BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis. *PloS one*, v. 9, n. 11, p. e112848, 14 jan. 2014.
- DA COSTA, A. C. et al. Modulation of Macrophage Responses by CMX, a Fusion Protein Composed of Ag85c, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 12 abr. 2017.
- DI CESARE, M. et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet*, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.
- EDER, K. et al. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation Research*, v. 58, n. 11, p. 727–736, 19 nov. 2009.

FORTES, Z. B.; LEME, J. G.; SCIVOLETTO, R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: possible role of insulin on the endothelial cell. *British Journal of Pharmacology*, v. 83, n. 3, p. 635–643, nov. 1984.

JEON, C. Y.; MURRAY, M. B. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 observational studies. *PLoS Medicine*, v. 5, n. 7, p. 1091–1101, 2008.

KAPUR, A. et al. Diabetes and tuberculosis co-epidemic: the Bali Declaration. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, v. 4, n. 1, p. 8–10, 1 jan. 2016.

KHAN, S. H. et al. Diet-induced obesity does not impact the generation and maintenance of primary memory CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 193, n. 12, p. 5873–82, 15 dez. 2014.

KIPNIS, A. et al. Memory T lymphocytes generated by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination reside within a CD4⁺ CD44^{lo} CD62⁺ ligand(hi) population. *Infection and immunity*, v. 73, n. 11, p. 7759–64, nov. 2005.

LIN, H. H. et al. Association of obesity, diabetes, and risk of tuberculosis: Two population-based cohorts. *Clinical Infectious Diseases*, v. 66, n. 5, p. 699–705, 2018.

LIU, F.; GUO, Z.; DONG, C. Influences of obesity on the immunogenicity of Hepatitis B vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 13, n. 5, p. 1014–1017, 4 maio 2017.

LÖNNROTH, K. et al. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. *The Lancet*, v. 375, n. 9728, p. 1814–1829, 2010.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of animal models of obesity. *Current protocols in pharmacology*, v. Chapter 5, p. Unit5.61, set. 2012.

MCBRIDE, J. A.; STRIKER, R. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLoS pathogens*, v. 13, n. 11, p. e1006624, 2017.

MCCALLISTER, J. W. et al. Obesity and acute lung injury. *Clinics in chest medicine*, v. 30, n. 3, p. 495–508, viii, set. 2009.

MOURITS, V. P. et al. Trained immunity as a novel therapeutic strategy. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 41, p. 52–58, 1 ago. 2018.

NARSALE, A. A.; CARSON, J. A. Role of interleukin-6 in cachexia. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, v. 8, n. 4, p. 321–327, dez. 2014.

NETEA, M. G.; VAN CREVEL, R. BCG-induced protection: Effects on innate immune memory. *Seminars in immunology*, v. 26, n. 6, p. 512–517, 23 out. 2014.

PATRICIA, S.; ALBORNOZ, P. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17147/tde-13092018-111209/publico/9119461_0_20180529.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2019.

PESSARAN, Z. et al. Immunophenotypic Characterization of Peripheral Blood T-Lymphocytes and Their Subpopulations in Tuberculosis Patients before and after Treatments. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, v. 4, n. 1, p. 23–6, mar. 2005.

RESENDE, D. P. et al. Non-classical circulating monocytes in severe obesity and obesity with uncontrolled diabetes: A comparison with tuberculosis and healthy individuals. *Tuberculosis*, v. 114, n. June 2018, p. 30–41, 2019.

RESTREPO, B. I. et al. Une évaluation transversale révèle une prévalence de diabète élevée dans les cas de diabète nouvellement diagnostiqués. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 89, n. 5, p. 352–359, 2011.

RESTREPO, B. I. Diabetes and tuberculosis fact sheet. v. 18, n. May, p. 32–36, 2012.

RISK, N. C. D.; COLLABORATION, F. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* (London, England), v. 387, n. 10027, p. 1513–1530, 2016.

SHAH, D. et al. Obesity-induced adipokine imbalance impairs mouse pulmonary vascular endothelial function and primes the lung for injury. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 11362, 12 set. 2015.

SHERIDAN, P. A. et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *International Journal of Obesity*, v. 36, n. 8, p. 1072–1077, 25 ago. 2012.

SIMÓ MIÑANA, J. et al. Hepatitis B vaccine immunoresponsiveness in adolescents: a revaccination proposal after primary vaccination. *Vaccine*, v. 14, n. 2, p. 103–6, fev. 1996.

SURWIT, R. S. et al. Original Articles Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. v. 37, n. 1850, p. 1163–1167, 1988.

UPPAL, S. S. et al. Comparison of CD4 and CD8 lymphocyte counts in HIV-negative pulmonary TB patients with those in normal blood donors and the effect of antitubercular treatment: Hospital-based flow cytometric study. *Cytometry*, v. 61B, n. 1, p. 20–26, set. 2004.

WEBER, D. J. et al. Obesity as a predictor of poor antibody response to hepatitis B plasma vaccine. *JAMA*, v. 254, n. 22, p. 3187–9, 13 dez. 1985.

WHO, W. H. O. Executive Summary. Geneva: World Health Organization, n. November 2017, p. 1–4, 2017.

WU, Y. et al. Changes in Lymphocyte Subsets in the Peripheral Blood of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *Journal of International Medical Research*, v. 37, n. 6, p. 1742–1749, dez. 2009.

YAO, S. et al. CD4⁺ T Cells Contain Early Extrapulmonary Tuberculosis (TB) Dissemination and Rapid TB Progression and Sustain Multieffector Functions of CD8⁺ T and CD3⁻ Lymphocytes: Mechanisms of CD4⁺ T Cell Immunity. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 5, p. 2120–2132, 1 mar. 2014.

YIN, Y. et al. The CD4⁺/CD8⁺ Ratio in Pulmonary Tuberculosis: Systematic and Meta-Analysis Article. *Iranian journal of public health*, v. 44, n. 2, p. 185–93, fev. 2015.

6. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez uma possível relação entre OBDM e TB por alterações similares na população de monócitos não clássicos em ambas essas doenças. Monócitos não clássicos de pacientes OBDM possuíam níveis semelhantes de expressão de CD86 que os de pacientes TB. No entanto, apenas os monócitos não clássicos de pacientes TB apresentaram aumento na expressão das citocinas IL-6 e IL-12, que não se correlaciona com a expressão de TLR-2 aumentada presente em todos os grupos. Interessantemente, a expressão de TLR-4 foi reduzida similarmente em todos os grupos. Apesar da diferença na expressão de citocinas pró-inflamatórias observada nos monócitos de pacientes OBDM e TB, ambos foram mais permissivos ao crescimento de *Mtb* mas não à outras micobactérias (*M. abscessus* subsp. *massiliense* por exemplo), quando comparado aos indivíduos OB e controles saudáveis, sugerindo que talvez esses monócitos sejam um fator comum no aumento da susceptibilidade à TB. Também avaliamos a capacidade do estado microinflamatório presente na obesidade de interferir na formação de resposta vacinal à BCG. Observamos que a obesidade induzida em camundongos após a vacinação com BCG parece interferir na indução do perfil de linfócitos TCD4⁺IFN γ ⁺ após o desafio com *M. tuberculosis*. Além disso, o tecido pulmonar dos animais obesos apresenta maior lesão quando comparados aos animais eutróficos. Também pode-se observar menor recrutamento de células inatas para o pulmão dos camundongos obesos, com predominância de macrófagos alveolares residentes.

No primeiro artigo, foi demonstrado que as populações de monócitos foram aumentadas, como esperado, em pacientes OBDM (DEVÊVRE et al., 2015), enquanto em pacientes OBDM, apenas monócitos não clássicos exibiram expressão mista dos marcadores de superfície CD86 e CD206. A expressão aumentada dessas moléculas pode refletir o estado inflamatório dessas doenças, visto que ambas essas moléculas são mediadores da inflamação e estimulam a produção de citocinas como IL-1 β e IL-6 (RAGGI et al., 2017) além de TNF- α , IL-18 e IL-8 e (SINDHU et al., 2015). Devido à importância de macrófagos na patologia da TB analisamos o perfil de monócitos circulantes em pacientes OBDM e TB. Os monócitos não clássicos de ambos os grupos de pacientes expressaram ambos CD86 e CD206, de forma similar, o que sugere relação entre as doenças visto que macrófagos com um perfil CD206⁺ são capazes de contribuir

para a resistência à insulina e desenvolvimento de DM (FESSLER; RUDEL; BROWN, 2009; WENTWORTH et al., 2010). A expressão de CD86⁺ em pacientes TB é ainda correlacionada com a piora da doença, contribuindo para o dano tecidual durante a infecção (FINDLAY; HUSSELL, 2012).

Dentre as diversas teorias sobre a predisposição de pacientes OBDM a desenvolver TB, uma recentemente demonstrada sugere que a fagocitose pode ser afetada pela obesidade (RAPOSO-GARCÍA et al., 2017). Isso nos levou a perguntar se os monócitos não clássicos dos pacientes OBDM e TB poderiam estar com a capacidade fagocítica alterada de forma similar, desse modo avaliamos a expressão de receptores de fagocitose nessas células. Nossos resultados demonstram que em relação à indivíduos saudáveis, pacientes OB e TB possuem expressão aumentada de TLR-2 em monócitos circulantes (Figura 5). Em contraste, a expressão de TLR-4 é reduzida em pacientes OB, OBDM e TB, uma possível explicação para essa redução é que esses receptores podem estar indisponíveis para identificação na superfície dos monócitos devido a internalização dos mesmos após a ligação (SHI; DAS; DAS, 2006).

Mtb desenvolveu vários mecanismos que exploram a ativação de TLR-2 para a evasão do sistema imune, por exemplo, ESAT-6 interage com TLR-2 inibindo a produção de IL-12 (PATHAK et al., 2007), hsp60 interage com TLR-2 estimulando a produção de IL-10 (PARVEEN et al., 2013), dentre outras. Dessa forma a maior expressão de TLR-2 pelos monócitos não clássicos tanto de pacientes OBDM quanto TB pode estar ligado à não eliminação do patógeno. Como observamos após a infecção *in vitro* de macrófagos desses pacientes com *Mtb*, onde as células de pacientes OBDM e TB não eliminam a bactéria tão bem quanto os controles (Figura 6). Isso sugere que alterações fenotípicas presentes nessas células em DM podem facilitar o crescimento de *Mtb* em monócitos pelo aumento da expressão de TLR-2. A não alteração no crescimento de *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Figura 7) corrobora a importância do aumento da expressão de TLR-2 nos monócitos não clássicos, visto que TLR-2 não é importante para a evasão da resposta imune para *M. abscessus* subsp. *massiliense* como é para *Mtb* (GEHRING et al., 2004; PECORA et al., 2006). Ademais, há também influência do diferente microambiente onde essas células foram “primadas” *in vivo*. Os estados inflamatórios e metabólicos dos pacientes onde essas células residiam podem ter influenciado na capacidade de contenção da infecção. Certo grau de imuno exaustão pode estar envolvido em pacientes OBDM (BI; TIAN, 2017), que pode tornar os macrófagos funcionalmente menos capazes de eliminar uma bactéria mais patogênica como *Mtb*. Outros estudos já

demonstraram que macrófagos derivados de pacientes DM possuem menor capacidade de eliminar várias cepas de Mtb (LOPEZ-LOPEZ et al., 2018).

Quando avaliamos essas células funcionalmente, isto é, sua capacidade de produção de citocinas, constatamos que apenas as células de pacientes TB demonstraram aumento na expressão de IL-12 e IL-6 (Figura 4). A baixa produção de citocinas pode ser explicada por pacientes OB e OBDM poderem estar em estado de imuno exaustão (WHERRY; KURACHI, 2015) e em um menor grau de ativação da resposta imune (BI; TIAN, 2017; KWAIJTAAL et al., 2007; LOPEZ-LOPEZ et al., 2018). A falta de resposta dessas células é um importante fator para o aumento de susceptibilidade à diversas infecções, inclusive TB, cuja resposta imune se baseia principalmente em células Th1 e Th17 (FERNÁNDEZ SOTO et al., 2018; SCRIBA et al., 2008), perfis celulares dependentes de citocinas como IL-12 e IL-6 (BHAUMIK; BASU, 2017; ZHU et al., 2012). Os elevados níveis de adiponectina encontrados em pacientes TB podem também estar correlacionados com uma maior susceptibilidade, visto que Mtb pode usar o tecido adiposo para se esconder do sistema imune e persistir no hospedeiro, gerando um aumento na produção de adiponectina pelo tecido adiposo (ELNEMR et al., 2015).

No segundo artigo, buscamos explorar se a obesidade pode interferir na formação de resposta vacinal à BCG, visto que já é sabido que pacientes obesos tem dificuldade em estabelecer resposta vacinal protetora frente vacinação contra outros patógenos (FAN et al., 2016a; LIU; GUO; DONG, 2017a; PARK et al., 2014; SHERIDAN et al., 2012). A obesidade induzida após a vacinação com BCG demonstrou a capacidade de interferir na indução do perfil de linfócitos TCD4⁺IFN γ ⁺ após o desafio com *M. tuberculosis*. Além disso, o tecido pulmonar dos animais obesos apresenta maior lesão quando comparados aos animais eutróficos. Também pode-se observar menor recrutamento de células inatas para o pulmão dos camundongos obesos, com predominância de macrófagos alveolares residentes.

Para avaliar a interferência da obesidade na vacinação com BCG, testamos se a obesidade interfere no resgate dessa resposta perante infecção, onde os animais foram vacinados antes do advento da obesidade. Observamos que quando os animais são vacinados antes de se tornarem obesos, ocorre redução de células T CD4⁺IFN γ ⁺ (Figura 2B), enquanto a vacinação em animais após se tornarem obesos não apresenta diferença estatística entre os animais eutróficos e obesos (Figura 9C). Esses dados sugerem que a obesidade interfere principalmente no resgate da resposta imune vacinal já formada do que na própria formação dessa resposta.

A vacina BCG é uma das melhores vacinas já desenvolvidas e atualmente a única forma de prevenção contra TB. No entanto, a BCG apresenta uma grande variação na proteção de indivíduos e falha na promoção de resposta adaptativa duradoura. Fatores inerentes tanto à BCG quanto ao paciente são considerados responsáveis pela variação na resposta induzida pela vacina tanto adaptativa, quando na resposta inata (MOLIVA; TURNER; TORRELLES, 2017). Por exemplo, a vacina BCG é uma poderosa indutora de imunidade treinada em células inatas, principalmente macrófagos (ARTS et al., 2018), resultando em melhor produção de TNF- α e IL-6 pelos macrófagos frente um segundo encontro com antígeno (MOURITS et al., 2018). Neste caso, um fator intrínseco do paciente seria a obesidade, de modo que o metabolismo energético alterado poderia influenciar nessas células treinadas, as quais passam por mudança em seu próprio metabolismo da glicose (Warburg effect) (MOURITS et al., 2018).

De fato, observamos uma maior migração de macrófagos e granulócitos para o pulmão de animais vacinados após obesos, em comparação com animais eutróficos (Figura 10). Sugerindo que a presença dessas células no órgão alvo da infecção pode propiciar a formação de memória inata e uma melhor resposta adaptativa posterior. Ademais, estudos sugerem que a susceptibilidade aumentada pela obesidade à tuberculose é dependente de NLRP3 (PATRICIA; ALBORNOZ, 2018); visto que a formação da imunidade treinada é dependente de sinalização via NOD2, receptor envolvido na formação de NLRP3, talvez a obesidade interfira na formação da resposta vacinal por esse mecanismo.

A interferência da obesidade e diabetes em respostas vacinais já é descrita para influenza e hepatite (GREEN; BECK, 2017; LIU; GUO; DONG, 2017a). Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avalia a resposta de BCG em animais obesos. A capacidade da obesidade em interferir no resgate da resposta formada, como sugerido neste trabalho, é preocupante frente a crescente epidemia de obesidade infantil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b), sendo este período onde a proteção da vacina BCG é mais crítica e evita a instalação de formas graves da tuberculose (RODRIGUES; DIWAN; WHEELER, 1993).

Outro fator de importância na geração de resposta vacinal é a microbiota de cada indivíduo (PRAHARAJ et al., 2015), que em pacientes obesos se encontra alterada, podendo influenciar na proteção. A microbiota intestinal de indivíduos eutróficos apresenta uma razão elevada entre os filos Bacteroidetes para Firmicutes, já na obesidade essa razão é invertida, havendo uma predominância do filo Firmicutes (JUMPERTZ et

al., 2011), dentre outras alterações. Interessantemente, já foi demonstrado que essa mesma inversão na proporção dessas bactérias está correlacionada com a falha no desenvolvimento de resposta à vacina contra rotavírus (MIYAZAKI et al., 2018). A vacina BCG, no entanto, não é administrada por via oral, o que poderia levantar o questionamento do envolvimento da microbiota intestinal em sua resposta. Todavia, a microbiota intestinal é capaz de produzir mediadores solúveis como os ácidos graxos de cadeia curta, capazes de mediar o desenvolvimento de diferentes perfis de célula T (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 2016). O butirato, por exemplo, tem sua produção aumentada em obesos (SCHWIERTZ et al., 2010) e é capaz de diferenciar células T reguladoras (FURUSAWA et al., 2013), que pode interferir na formação da resposta vacinal.

Ademais, com o aumento da obesidade infantil em países em desenvolvimento (GUPTA et al., 2012) pode-se pensar que, assim como a hipótese da higiene sugere que a exposição reduzida a microrganismos em idade precoce pode ocasionar maior suscetibilidade à alergias, é possível que a microbiota intestinal de indivíduos com maior exposição a antígenos, como em países em desenvolvimento, os deixe mais “tolerantes” à vacinação, sendo dificultados em obter uma resposta adequada em comparação com indivíduos que vivem em melhores condições socioeconômicas.

No geral, aqui demonstramos que a obesidade e diabetes são importantes comorbidades da tuberculose e obstáculos relevantes na luta para a eliminação dessa doença como grave problema de saúde pública, como objetivado pela OMS até o ano de 2050 (LÖNNROTH et al., 2010a). A obesidade pode não somente tornar indivíduos adultos mais susceptíveis à infecção, como sugerido na primeira parte dessa tese, como também interferir no desenvolvimento de resposta vacinal em crianças. Assim como o HIV, a obesidade e diabetes devem ser levadas em consideração para o cumprimento das normas da OMS.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliado a relação entre obesidade e tuberculose quanto à resposta imune frente à infecção e à vacinação. Após a avaliação de populações celulares estimulados em ambas as doenças em humanos e após vacinação com BCG em camundongos concluiu-se que:

- A população de monócitos não clássicos pode ser um link entre OBDM e TB e pode ser um dos fatores que contribuem para a associação dessas duas doenças, devido a várias similaridades fenotípicas e funcionais encontradas nessas células em ambas as doenças.
- Monócitos de indivíduos OBDM e TB são mais susceptíveis a infecção por *M. tuberculosis in vitro*.
- A obesidade/diabetes, desenvolvida ao longo da vida não prejudica o resgate da resposta vacinal à BCG frente infecção por *M. tuberculosis*.

REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, S. S. et al. The Role of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP)-1B in Cardiovascular Disease and Its Interplay with Insulin Resistance. **Biomolecules**, v. 9, n. 7, p. 286, 17 jul. 2019.
- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH₂-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser³⁰⁷. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 9047–9054, 24 mar. 2000.
- AHMAD, R. et al. Increased adipose tissue expression of TLR8 in obese individuals with or without type-2 diabetes: Significance in metabolic inflammation. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, 2016.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006.
- AL-GOBLAN, A. S.; AL-ALFI, M. A.; KHAN, M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy**, v. 7, p. 587–91, 2014.
- ALVIM, R. O. et al. General aspects of muscle glucose uptake. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 351–368, 6 mar. 2015.
- AMRANI, A. et al. Interleukin-1 effect on glycemia in the non-obese diabetic mouse at the pre-diabetic stage. **The Journal of endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 139–48, jan. 1996.
- ANDRADE, B. B. et al. Mycobacterial Antigen Driven Activation of CD14⁺⁺CD16[–] Monocytes Is a Predictor of Tuberculosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004433, 2 out. 2014.
- AZEVEDO, M. J.; GROSS, J. L. Aspectos especiais da dieta no tratamento do diabetes melito. **Rev. AMRIGS**, v. 34, n. 3, p. 181–6, [s.d.].
- BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715–1724, 2005.
- BAHAT, G. et al. Which body mass index (BMI) is better in the elderly for functional

status? **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 54, n. 1, p. 78–81, jan. 2012.

BESSESEN, D. H. Update on obesity. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 6, p. 2027–34, jun. 2008.

BHATTACHARYYA, S. et al. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I B kinase activity. **Blood**, v. 104, n. 4, p. 1100–1109, 22 abr. 2004.

BHAUMIK, S.; BASU, R. Cellular and Molecular Dynamics of Th17 Differentiation and its Developmental Plasticity in the Intestinal Immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

BI, J.; TIAN, Z. NK cell exhaustion. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUN, 2017.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDER, A.; KAHN, C. R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 1, 1 jan. 2014.

BRACE, P. T. et al. Mycobacterium tuberculosis subverts negative regulatory pathways in human macrophages to drive immunopathology. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 1–25, 2017.

BRAGA GOMES, K.; FONTANA RODRIGUES, K.; PAULA FERNANDES, A. The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Nephropathy. **International Journal of Medical Genetics**, v. 2014, p. 6, 2014.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 15, n. 4, p. 798–808, abr. 2007.

BURGDORF, S.; KURTS, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. **Curr Opin Immunol**, v. 20, n. 1, p. 89–95, 2008.

CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J.; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 16 Suppl 1, n. Suppl1, p. S27-36, mar. 2012.

CASTAÑO, D.; GARCÍA, L. F.; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16+monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v. 91, n. 5, p. 348–360, 2011.

- CASTRO, G. et al. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. **Elsevier**, v. 3, p. 443–449, 2013.
- CHO, H. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and Obesity. In: **Vitamins and hormones**. [s.l: s.n.]. v. 91p. 405–424.
- CHOI, K.; KIM, Y.-B. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. **The Korean journal of internal medicine**, v. 25, n. 2, p. 119–29, jun. 2010.
- COLLINS, S. et al. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 243–248, abr. 2004.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 4, p. e73, 22 abr. 2016.
- COUSINS, D. V et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, n. Pt 5, p. 1305–14, set. 2003.
- DEVÊVRE, E. F. et al. Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3917–3923, 2015.
- DIBASE, J. K. et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. **Mayo Clinic proceedings**, v. 83, n. 4, p. 460–9, abr. 2008.
- ELLULU, M. S. et al. Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. **Archives of Medical Science**, v. 13, n. 4, p. 851–863, 2017.
- ELNEMR, G. M. et al. Adiponectin Levels as a Marker of Inflammation in Pulmonary Tuberculosis. v. 59, p. 208–213, 2015.
- FAN, W. et al. Hepatitis B vaccine response in obesity: A meta-analysis. **Vaccine**, v. 34, n. 40, p. 4835–4841, 2016a.
- FAN, W. et al. Hepatitis B vaccine response in obesity: A meta-analysis. **Vaccine**, v. 34, n. 40, p. 4835–4841, 14 set. 2016b.
- FERNÁNDEZ SOTO, G. F. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection: Participation of TH1, TH2, TH17 and regulatory T cells in the immune response. **Acta Medica Iranica**, v. 56, n. 8, p. 484–493, 2018.

- FERNSTRÖM, M. et al. Improved Muscle Mitochondrial Capacity Following Gastric Bypass Surgery in Obese Subjects. **Obesity surgery**, 15 out. 2015.
- FESSLER, M. B.; RUDEL, L. L.; BROWN, J. M. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. **Current Opinion in Lipidology**, v. 20, n. 5, p. 379–385, out. 2009.
- FESTA, A. et al. Elevated Levels of Acute-Phase Proteins and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Predict the Development of Type 2 Diabetes: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1131–1137, 1 abr. 2002.
- FINDLAY, E. G.; HUSSELL, T. Macrophage-Mediated Inflammation and Disease: A Focus on the Lung. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.
- FLIER, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 337–50, 23 jan. 2004.
- FRÜHBECK, G. et al. Regulation of adipocyte lipolysis. **Nutrition Research Reviews**, v. 27, n. 1, p. 63–93, 28 jun. 2014.
- FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446–450, 13 dez. 2013.
- GEHRING, A. J. et al. Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 4, p. 2660–8, 15 ago. 2004.
- GONDRET, F.; FERRÉ, P.; DUGAIL, I. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 1, p. 106–13, 1 jan. 2001.
- GORNIK, I.; GORNIK, O.; GAŠPAROVIĆ, V. HbA1c is outcome predictor in diabetic patients with sepsis. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, n. 1, p. 120–125, jul. 2007.
- GREEN, W. D.; BECK, M. A. Obesity impairs the adaptive immune response to influenza virus. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 14, n. November, p. S406–S409, 2017.
- GRIFFIN, B. A. Lipid metabolism. **Surgery (United Kingdom)**, v. 31, n. 6, p. 267–

272, 2013.

GUPTA, N. et al. Childhood Obesity in Developing Countries: Epidemiology, Determinants, and Prevention. **Endocrine Reviews**, v. 33, n. 1, p. 48–70, 1 fev. 2012.

GUSTAFSON, B. et al. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 193–200, abr. 2015.

HAAS, J. T. et al. Hepatic Insulin Signaling Is Required for Obesity-Dependent Expression of SREBP-1c mRNA but Not for Feeding-Dependent Expression. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 873–884, 6 jun. 2012.

HAMEED, I. et al. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 4, p. 598–612, 15 maio 2015.

HATANAKA, E. et al. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 3, p. 443–447, dez. 2006.

HETLAND, G.; WIKER, H. G. Antigen 85C on Mycobacterium bovis, BCG and M. tuberculosis promotes monocyte-CR3-mediated uptake of microbeads coated with mycobacterial products. **Immunology**, v. 82, n. 3, p. 445–9, jul. 1994.

HUANG, X. et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. **International journal of biological sciences**, v. 14, n. 11, p. 1483–1496, 2018.

IBGE :: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/default.shtm>. Acesso em: 12 jun. 2019.

IQBAL, J.; HUSSAIN, M. M. Intestinal lipid absorption. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1183-94, jun. 2009.

ISRAËL, A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 3, p. a000158, mar. 2010.

JEON, C. Y.; MURRAY, M. B. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 7, p. e152, 15 jul. 2008.

JOHNSON, P. R. et al. Animal Models of Obesity: Genetic Aspects. **Annual Review of**

Nutrition, v. 11, n. 1, p. 325–353, jul. 1991.

JUMPERTZ, R. et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 58–65, 1 jul. 2011.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494–1505, 1 jun. 2006.

KEICHO, N. et al. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: Markers of metabolism and inflammation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 2–9, 2012.

KEITH, S. W. et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. **International journal of obesity (2005)**, v. 30, n. 11, p. 1585–94, 27 nov. 2006.

KENNEDY, A. et al. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 1, p. 1–4, 3 dez. 2008.

KIM, M.-J. et al. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 258–274, jul. 2010.

KIM, T. S. et al. Mycobacterium massiliense induces inflammatory responses in macrophages through Toll-like receptor 2 and c-Jun N-terminal kinase. **Journal of clinical immunology**, v. 34, n. 2, p. 212–23, fev. 2014.

KUREBAYASHI, Y. et al. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 Axis Controls Th17 Differentiation by Regulating Gfi1 Expression and Nuclear Translocation of ROR γ . **Cell Reports**, v. 1, n. 4, p. 360–373, 19 abr. 2012.

KWAIJTAAL, M. et al. Exhaustion is associated with low macrophage migration inhibitory factor expression in patients with coronary artery disease. **Psychosomatic Medicine**, v. 69, n. 1, p. 68–73, 2007.

LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 15–28, 10 jan. 2016.

LAMAS, O.; MARTINEZ, J. A.; MARTI, A. T-helper lymphopenia and decreased

mitogenic response in cafeteria diet-induced obese rats. **Nutrition Research**, v. 22, n. 4, p. 497–506, 1 abr. 2002.

LARGE, V. et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. **Diabetes & metabolism**, v. 30, n. 4, p. 294–309, set. 2004.

LEE, J. Y. et al. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16683–16689, 18 maio 2001.

LEISCHING, G. R. Susceptibility to Tuberculosis is associated with PI3K-dependent increased mobilization of neutrophils. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUL, 2018.

LIN, Y. et al. The Hyperglycemia-induced Inflammatory Response in Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4617–4626, 11 fev. 2005.

LIU, F.; GUO, Z.; DONG, C. Influences of obesity on the immunogenicity of Hepatitis B vaccine. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 5, p. 1014–1017, 2017a.

LIU, F.; GUO, Z.; DONG, C. Influences of obesity on the immunogenicity of Hepatitis B vaccine. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, n. 5, p. 1014–1017, 4 maio 2017b.

LÖNNROTH, K. et al. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. **The Lancet**, v. 375, n. 9728, p. 1814–1829, 2010a.

LÖNNROTH, K. et al. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. **International journal of epidemiology**, v. 39, n. 1, p. 149–55, fev. 2010b.

LOPEZ-LOPEZ, N. et al. Type-2 diabetes alters the basal phenotype of human macrophages and diminishes their capacity to respond, internalise, and control Mycobacterium tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, p. 1–11, 2018.

LUMENG, C. N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MANSBACH, C. M.; SIDDIQI, S. A. The biogenesis of chylomicrons. **Annual review**

of physiology, v. 72, p. 315–33, 2010.

MASTERS, S. L. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β 2 in type 2 diabetes. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 897–904, 2010.

MATTOS, R. T. et al. Chronic Low-Grade Inflammation in Childhood Obesity Is Associated with Decreased IL-10 Expression by Monocyte Subsets. **Plos One**, v. 11, n. 12, p. e0168610, 2016.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 1–16, 15 jan. 2010.

MIN, D. et al. Alterations in Monocyte CD16 in association with diabetes complications. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

MIYAZAKI, A. et al. Protein deficiency reduces efficacy of oral attenuated human rotavirus vaccine in a human infant fecal microbiota transplanted gnotobiotic pig model. **Vaccine**, v. 36, n. 42, p. 6270–6281, 8 out. 2018.

MOLIVA, J. I.; TURNER, J.; TORRELLES, J. B. Immune Responses to Bacillus Calmette-Guérin Vaccination: Why Do They Fail to Protect against Mycobacterium tuberculosis? **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 407, 2017.

NEIDICH, S. D. et al. Increased risk of influenza among vaccinated adults who are obese. **International journal of obesity (2005)**, v. 41, n. 9, p. 1324–1330, 2017.

O'ROURKE, R. W. Inflammation in obesity-related diseases. **Surgery**, v. 145, n. 3, p. 255–9, mar. 2009.

O'SHEA, D. et al. Natural Killer Cells in Obesity: Impaired Function and Increased Susceptibility to the Effects of Cigarette Smoke. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8660, 25 jan. 2010.

OTTAVIANI, E.; MALAGOLI, D.; FRANCESCHI, C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. **General and comparative endocrinology**, v. 174, n. 1, p. 1–4, 1 out. 2011.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457–461, 15 out. 2004.

- PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. Immunity and Immunopathology in the Tuberculous Granuloma. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 6 nov. 2014.
- PAL, R. et al. Diabetes Mellitus as Hub for Tuberculosis Infection: A Snapshot. **International Journal of Chronic Diseases**, v. 2016, p. 1–7, 12 out. 2016.
- PARK, H. L. et al. Obesity-induced chronic inflammation is associated with the reduced efficacy of influenza vaccine. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 5, p. 1181–1186, 2014.
- PARK, H. S.; PARK, J. Y.; YU, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 69, n. 1, p. 29–35, jul. 2005.
- PARVEEN, N. et al. Endocytosis of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 60 is required to induce interleukin-10 production in macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 34, p. 24956–71, 23 ago. 2013.
- PATHAK, S. K. et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nature Immunology**, v. 8, n. 6, p. 610–618, 7 jun. 2007.
- PAVAN KUMAR, N. et al. Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary or latent tuberculosis results in modulation of adipocytokines. **Cytokine**, v. 79, p. 74–81, 2016.
- PECHT, T. et al. Circulating Blood Monocyte Subclasses and Lipid-Laden Adipose Tissue Macrophages in Human Obesity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2016.
- PECORA, N. D. et al. Mycobacterium tuberculosis LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 1, p. 422–9, 1 jul. 2006.
- PRADHAN, A. D. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. **Jama**, v. 286, n. 3, p. 327–334, 2001.
- PRAHARAJ, I. et al. Probiotics, antibiotics and the immune responses to vaccines. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1671, p. 20140144, 19 jun. 2015.
- RAGGI, F. et al. Regulation of human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by

- hypoxia and the Triggering receptor expressed on Myeloid cells-1. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2017.
- RAPOSO-GARCÍA, S. et al. Immunological response to Mycobacterium tuberculosis infection in blood from type 2 diabetes patients. **Immunology Letters**, v. 186, n. March, p. 41–45, 2017.
- RESTREPO, B. I. Diabetes and tuberculosis. [s.d.].
- RIVERA-MARRERO, C. A. et al. *M. tuberculosis* induction of matrix metalloproteinase-9: the role of mannose and receptor-mediated mechanisms. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 3, p. L546–L555, mar. 2002.
- RODRIGUES, L. C.; DIWAN, V. K.; WHEELER, J. G. Protective Effect of BCG against Tuberculous Meningitis and Miliary Tuberculosis: A Meta-Analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 22, n. 6, p. 1154–1158, dez. 1993.
- ROSSMEISL, M. et al. Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 52, n. 8, p. 1958–66, ago. 2003.
- SAMPATH, P. et al. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. July, p. 1–8, 2018.
- SANCHEZ, A. et al. Mycobacterium tuberculosis 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 1, p. 20–28, 2009.
- SÁNCHEZ, M. D. et al. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 9–10, p. 2492–2500, 2006.
- SANDERS, F. W. B.; GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 91, n. 2, p. 452–68, maio 2016.
- SANTOS, L. M. P. et al. Trends in Morbid Obesity and in Bariatric Surgeries Covered by the Brazilian Public Health System. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 7, p. 943–948, 7 jun. 2008.
- SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o

papel da transição nutricional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S29–S36, 2003.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 190–195, jan. 2010.

SCRIBA, T. J. et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 3, p. 1962–70, 1 fev. 2008.

SHERIDAN, P. A. et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 8, p. 1072–1077, 25 ago. 2012.

SHI, D.; DAS, J.; DAS, G. Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals. **Cell Research**, v. 16, n. 1, p. 70–74, 16 jan. 2006.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. **The journal of clinical investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 2006.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169–80, 5 maio 2007.

SIMÓ MIÑANA, J. et al. Hepatitis B vaccine immunoresponsiveness in adolescents: a revaccination proposal after primary vaccination. **Vaccine**, v. 14, n. 2, p. 103–6, fev. 1996.

SINDHU, S. et al. Changes in the Adipose Tissue Expression of CD86 Costimulatory Ligand and CD163 Scavenger Receptor in Obesity and Type-2 Diabetes: Implication for Metabolic Disease. **Journal of Glycomics & Lipidomics**, v. 05, n. 04, 10 nov. 2015.

SMITH, S. C.; HASLAM, D. Abdominal obesity, waist circumference and cardio-metabolic risk: awareness among primary care physicians, the general population and patients at risk--the Shape of the Nations survey. **Current medical research and opinion**, v. 23, n. 1, p. 29–47, 29 jan. 2007.

STEW, S. S. et al. Differential expression of monocyte surface markers among TB patients with diabetes co-morbidity. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 93 Suppl, n. 0, p. S78-82, dez. 2013.

STURM, R. Increases in morbid obesity in the USA: 2000-2005. **Public health**, v. 121,

n. 7, p. 492–6, jul. 2007.

SUMMERS, S. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 1, p. 42–72, jan. 2006.

SUN, Q. et al. Significance of the frequency of CD4+CD25+CD127– T-cells in patients with pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus. **Respirology**, v. 17, n. 5, p. 876–882, jul. 2012.

SWAROOP, J. J.; RAJARAJESWARI, D.; NAIDU, J. N. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **The Indian journal of medical research**, v. 135, n. 1, p. 127–30, 2012.

ŚWIDERSKA, E. et al. Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In: **Glucose Transport [Working Title]**. [s.l.] IntechOpen, 2018.

TANAKA, S.-I. et al. T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF- α in human obesity: adequate weight reduction can be corrective. **Clinical Endocrinology**, v. 54, n. 3, p. 347–354, 1 mar. 2001.

TORRES-CASTRO, I. et al. Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. **Immunology Letters**, v. 176, p. 81–89, 2016.

TROUWBORST, I. et al. Ectopic Fat Accumulation in Distinct Insulin Resistant Phenotypes; Targets for Personalized Nutritional Interventions. **Frontiers in nutrition**, v. 5, p. 77, 2018.

URIBARRI, J. et al. Elevated serum advanced glycation endproducts in obese indicate risk for the metabolic syndrome: a link between healthy and unhealthy obesity? **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, n. 5, p. 1957–66, maio 2015.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H.; VAN DER MEER, J. W. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 294–309, 2002.

WANG, C.; LIAO, J. K. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. v. 821, n. 5, p. 1–11, 2012.

WANG, T.; HE, C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 44, p. 38–50, 1 dez. 2018.

- WENSVEEN, F. M. et al. Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 322–333, 1 set. 2015.
- WENTWORTH, J. M. et al. Pro-inflammatory CD11c+ CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. **Diabetes**, v. 59, n. July, 2010.
- WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 486–499, 2015.
- WHITE, J. R. et al. Clarifying the Role of Insulin in Type 2 Diabetes Management. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. 1, p. 14–21, 1 jan. 2003.
- WHO. **The end TB STraTegy global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.who.int/tb/strategy/End_TB_Strategy.pdf?ua=1>. Acesso em: 13 jun. 2019a.
- WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014** World Health. [s.l: s.n.].
- WHO. **Global Tuberculosis Report**. [s.l: s.n.].
- WISSE, B. E.; KIM, F.; SCHWARTZ, M. W. Physiology. An integrative view of obesity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5852, p. 928–9, 9 nov. 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Commission of Ending Childhood Obesity. **World Health Organization**, p. 1–50, 2016b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. BCG vaccine: WHO position paper, February 2018 – Recommendations. **Vaccine**, v. 36, n. 24, p. 3408–3410, 7 jun. 2018.
- WOUTERS, K. et al. Circulating classical monocytes are associated with CD11c+ macrophages in human visceral adipose tissue. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 42665, 2017.
- WYATT, S. B.; WINTERS, K. P.; DUBBERT, P. M. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. **The**

- American journal of the medical sciences**, v. 331, n. 4, p. 166–74, abr. 2006.
- XITA, N.; TSATSOULIS, A. Adiponectin in diabetes mellitus. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 32, p. 5451–8, 2012.
- XU, X. et al. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. **Seminars in liver disease**, v. 33, n. 4, p. 301–11, nov. 2013.
- YAMASHIRO, S. et al. Lower expression of Th1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 139, n. 1, p. 57, jan. 2005.
- YANG, H. et al. 25(OH)D(3) affects the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells stimulated by *Mycobacterium bovis* BCG. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48062, jan. 2012.
- YORKE, E. et al. The Bidirectional Relationship between Tuberculosis and Diabetes. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2017, p. 1–6, 12 nov. 2017.
- ZABOLOTNY, J. M. et al. Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5187–92, 24 abr. 2001.
- ZAMMIT, C. et al. Obesity and respiratory diseases. **International Journal of General Medicine**, v. 3, p. 335, 2010.
- ZHANG, D. et al. Resistance to high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Cell metabolism**, v. 11, n. 5, p. 402–11, 5 maio 2010.
- ZHANG, X. et al. Inhibition of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in T lymphocytes in patients with active tuberculosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 59, p. 110–117, jun. 2017.
- ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88–98, 8 fev. 2018.
- ZHU, J. et al. The Transcription Factor T-bet Is Induced by Multiple Pathways and

Prevents an Endogenous Th2 Cell Program during Th1 Cell Responses. **Immunity**, v. 37, n. 4, p. 660–673, 19 out. 2012.

ANEXOs

Anexo 1 – Comprovantes de submissão dos artigos/ aceite para publicação para artigos ainda não publicados/ DOI dos artigos publicados

Tuberculosis 114 (2019) 30–41

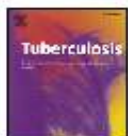


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Tuberculosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tube



Immunological Aspects

Non-classical circulating monocytes in severe obesity and obesity with uncontrolled diabetes: A comparison with tuberculosis and healthy individuals



Danilo Pires Resende^a, Adeliane Castro da Costa^a, Lorena Pereira de Souza Rosa^{b,c}, Ana Paula Rodrigues^{b,c}, Annelise Silva e Alvez Santos^{b,c}, Camila Kellen Cardoso^{b,c}, Jaqueline Danesio Sousa^d, André Kipnis^e, Erika Aparecida Silveira^{b,c}, Ana Paula Junqueira-Kipnis^{a,*}

^a Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, CEP 74605-050 Brasil

^b Hospital das Clínicas- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina- UFG, Goiânia, GO, Brasil

^c Primeira Avenida, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, CEP 75605-020 Brasil

^d Universidade do Norte do Paraná, Avenida Parigot, 675, Jardim Pina, CEP 86041-120, Londrina, Paraná, Brasil

^e Laboratório de Bacteriologia Molecular, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, CEP 74605-050 Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:
Metabolism
Co-infection
Risk groups
Severe obesity
CD14⁺ CD16⁺

ABSTRACT

Severe obesity and diabetes lead to a significant decrease in quality of life. Although controversial, population-wide studies have implicated obesity in the development of tuberculosis (TB). Non-classical monocytes have been described in obesity and TB, whereas in diabetes they have been associated with poorer clinical outcomes. The present study focuses on the functional significance of several monocyte populations of obese, obesity-related diabetic (ORDM), non-obese/diabetic tuberculosis and non-obese healthy control patients. Monocytes were evaluated by measuring expression of CD86, CD206, TLR-2 and TLR-4 as well as production of IL-6, IL-12, and by using a mycobacterial growth inhibition assay for both *Mycobacterium tuberculosis* and *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Non-classical monocytes from ORDM and non-obese TB patients exhibited similar activation profiles (CD86/CD206/TLR-2 and TLR-4 expressions). Only monocytes from TB patients had a higher positivity for IL-12 and IL-6, whereas adiponectin serum levels increased similarly between TB and ORDM patients. Monocytes from active TB patients and ORDM were more permissive to *Mtb* growth than obese individuals, but this susceptibility was not observed for *M. abscessus* subsp. *massiliense*. From these findings, we conclude that diabetes and tuberculosis had similarities in the population of circulating non-classical monocytes, improving our understanding of the association of these diseases.

1. Introduction

Chronic conditions that are associated with inflammation, such as obesity (OB), diabetes mellitus (DM) and tuberculosis (TB) are serious public health problems. The obesity epidemic is increasing around the world; between 1980 and 2014, the prevalence of obesity among adults, aged 18 and older, nearly doubled. In 2014, 39% of adults were overweight and 11% were classified as obese, totaling more than 500 million people with obesity [1]. As diabetes is associated with obesity, the prevalence of diabetes also increased in the same period, rising to 9% of the adult population worldwide, totaling 422 million people with diabetes [2].

Obesity is characterized by secretion by the adipose tissue of inflammatory mediators like IL-1, IL-6, leptin, TNF- α and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) among others [3,4]. Diabetes patients also present elevated circulating levels of acute phase proteins and inflammatory cytokines such as IL-1 and IL-6 [5,6], as well as NLRP3 activation [7]. Thus, obesity and diabetes are classified as chronic inflammatory diseases [3].

Monocytes are mononuclear phagocytes generated in the bone

* Corresponding author. Rua 235 esquina com Primeira Avenida, S/N. Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, Goiás, CEP 74605-050, Brasil.
E-mail address: ana.kipnis@ufg.br (A.P. Junqueira-Kipnis).

<https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.11.003>

Received 25 June 2018; Received in revised form 1 November 2018; Accepted 2 November 2018
1472-9792/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anexo 2 – Pareceres consubstanciados de aprovação do comitês de ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos genéticos, inflamação e risco cardiovascular na obesidade grave: efetividade de intervenção nutricional com azeite de oliva.

Pesquisador: Erika Aparecida da Silveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31642214.3.0000.5078

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 747.792

Data da Relatoria: 14/08/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de ensaio clínico controlado, randomizado e cego com obesos graves. O estudo será realizado no Ambulatório de Nutrição em Obesidade Grave (ANOG) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar polimorfismos genéticos e marcadores inflamatórios em obesos graves e suas relações na efetividade da intervenção nutricional com azeite de oliva sobre a composição corporal, perda ponderal, risco cardiovascular e parâmetros bioquímicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos aos participantes deste estudo estão relacionados ao desconforto em responder aos questionários que podem ser demorados.

Benefícios:

Os benefícios com relação à participação no estudo são o acompanhamento de saúde por equipe especializada; a realização de diversos exames que não fazem parte do acompanhamento de saúde feito na rede pública e que serão entregues impressos ao paciente permitindo encaminhamento a outros profissionais se necessário; e a realização de tratamento que já foi

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 747.792

testado e

promoveu resultados efetivos em médio

prazo nos parâmetros de saúde em obesos graves. Os possíveis sujeitos da pesquisa serão todos os pacientes que se adequarem aos critérios de inclusão que estão sendo encaminhados pela secretaria municipal de saúde. Aqueles que não atenderem aos critérios de inclusão da pesquisa permaneceram em atendimento de rotina na equipe em dias diferentes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem descrito, os pesquisadores apresentam formação e qualificação adequadas para o estudo proposto e os benefícios foram adequadamente descritos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Esta pesquisa está de acordo com os preceitos éticos da Resolução 466/2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Após início, o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, via Plataforma Brasil, relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações. O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcufg@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 747.792

GOIANIA, 12 de Agosto de 2014

Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitario

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcufg@yahoo.com.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 20 de agosto de 2018.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO
PROTOCOLO N. 040/18**

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa – (Mestrado, Doutorado, Outros)

II - Identificação:

❑ **Data de apresentação a CEUA:** 12/06/2018

❑ **Título do projeto:** Impacto da obesidade sobre efeito protetor e resposta imune induzida por vacinação com BCG e ECMX.

❑ **Pesquisador Coordenador no SIGAA/ Unidade:** Prof. Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis/IPTSP

❑ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Prof. Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis/IPTSP

❑ **Pesquisadores Participantes/ Unidade:** Adeliane Castro da Costa, André Kipnis, Danilo Pires de Resende.

Médico Veterinário/CRMV: Daniel Silva Goulart / CRMV GO 4632

❑ **Unidade onde será realizada a pesquisa:** IPTSP/UFG

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Justificativa: A obesidade é uma condição que altera a resposta imunologia dos indivíduos e, embora a maioria das vacinas sejam administradas nos primeiros meses de vida, algumas precisam de um reforço mais tardiamente, numa fase da vida onde o indivíduo pode estar obeso e não sabe como essa condição pode afetar a eficiência das vacinas. **Objetivo geral:** Avaliar a resposta imune de animais obesos diabéticos após vacinação com BCG e desafio com vacina de subunidade protéica ECMX e avaliar o efeito da obesidade na proteção conferida por essas vacinas contra a tuberculose. **Objetivos específicos:** Otimizar da vacina ECMX; avaliar os linfócitos T reguladores, Th1 e Th17 circulantes de camundongos obesos hiperglicêmicos; determinar as lesões do tecido adiposo e pulmonar de obesos hiperglicêmicos infectados ou não por *Mycobacterium tuberculosis*; avaliar a carga bacilar de camundongos obesos hiperglicêmicos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*.

IV - Sumário do projeto:

❑ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** Os autores justificam que são escassos e pouco eficientes os métodos alternativos e o número de animais está baseado em análises estatísticas com um número reduzido de animais por grupo por se tratarem de animais isogênicos.

❑ **Prevê Projeto Piloto:** Sim

❑ **Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** Serão Utilizados 32 camundongos, machos, isogênicos, C57BL/6, pesando 20 gramas no início dos experimentos.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



- ❑ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** Serão Utilizados 32 camundongos, machos, isogênicos, C57BL/6, pesando 20 gramas no início dos experimentos. Divididos em 8 grupos com 4 animais cada.
- ❑ **Fonte de obtenção do animal:** Biotério do CEMIB UNICAMP- Campinas, São Paulo
- ❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os animais serão mantidos em gaiolas (dimensões de 28 cm de comprimento por 17 cm de largura, portanto, área total de 476 cm²) contendo maravalha, com água acidificada, parte dos animais receberam dieta hipercalórica, a base de ração composta por 60% lipídios, 20% carboidratos e 20% proteínas, será oferecida 5g de ração por animal por dia durante 12 semanas. Os demais animais receberam ração balanceada *ad libidum*. A limpeza das gaiolas será realizada semanalmente, assim como a troca da ração e água. Rolos de papel serão fornecidos para enriquecimento ambiental. Os animais receberão ocasionalmente, semente de girassol para aumentar o suprimento de vitaminas e minerais que ocorrem durante a autoclavação de qualquer ração animal. Os animais serão mantidos na sala Vacinômica no Biotério do IPTSP. Os camundongos serão reunidos em grupos de no máximo 5 animais (padrão 4 e 3 animais) e mantidos em microisoladores autoclaváveis, com água e dieta *ad libitum*. Estes microisoladores são acoplados à estante ventilada do tipo gabinete (Insight Gabinetes para Biotério) contendo filtros HEPA na entrada e na saída do ar. A estante possui controladores de temperatura e umidade, que serão mantidas a 22-24°C e 55% ±10, respectivamente. A porta desta estante ventilada é fechada hermeticamente garantindo total controle da circulação de ar externo, assim como redução de ruídos externos. O ciclo de iluminação do ambiente será de 12h, (da sala, assim como das estantes) e qualquer fonte de ruídos dentro do biotério que proporcionem estresse aos animais será minimizada, pois o laboratório de Vacinômica apresenta duas portas com vedação em silicone em todas as suas extremidade e janelas que são mantidas sempre fechadas além de ar condicionado para manutenção da temperatura dentro da sala. A entrada de pessoas na sala de experimentação Vacinômica é restrita a três indivíduos extremamente treinados para tal fim. Todos os materiais utilizados na rotina desta sala são autoclavados (água, ração, gaiolas, palha, material cirúrgico, pijamas cirúrgicos e jalecos) antes do uso para manter os animais em ambientes com ausência de contaminantes e depois do uso para evitar contaminação do ambiente e dos participantes com os agentes infecciosos estudados.
- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Será inoculada nos camundongos a bactéria *M. tuberculosis*. Os riscos aos pesquisadores serão minimizados, pois para entrar na sala Vacinômica é necessário trocar de roupa na ante sala limpa (jaleco cirúrgico, sapatos internos, calçar pro-pés, touca e máscara N95- específica para trabalhar com agentes infecciosos transmissíveis pelo ar), luvas cirúrgicas aderidas ao jaleco por fita crepe e não portar nenhum adereço (brinco, celular e etc). Após a entrada na sala Vacinômica, um par de luvas será calçado por cima da luva anterior. As roupas de uso interno são retiradas antes da entrada na ante-sala limpa, acondicionadas em sacos de autoclave juntamente com as luvas externas, máscaras, pro-pés e toucas, que após fechados serão acondicionados novamente em saco de autoclavação limpo, e nesta etapa as luvas internas serão retiradas e embaladas em lixo próprio para também serem autoclavadas. Por fim, todo o material a ser

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



descartado estará acondicionado nos devidos sacos para autoclavação os quais serão lacrados com fita e descontaminados externamente com formol a 5%. Após essa descontaminação, o material será acondicionado em mais um saco já na ante-sala limpa, antes de ser encaminhado para autoclavação. Esta prática refere-se ao acondicionamento duplo de qualquer material possivelmente contaminado com *M. tuberculosis*. Toda a manipulação dos animais bem como do agente infeccioso *M. tuberculosis*, será realizada dentro de fluxo laminar de nível III de biossegurança (Airstream® Class III Biosafety Cabinet Esco- Airstream Class III biohazard safety cabinets offer the highest level of product, operator and environmental protection from infectious/biohazardous aerosols and are suitable for microbiological work with agents assigned to biological safety levels 1, 2, 3, or 4), presente no biotério de experimentação Vacinômica. Explicando melhor, esta cabine de fluxo laminar contém filtros HEPA que filtram todo o ar que circula dentro da cabine, e como os isoladores serão apenas abertos dentro do fluxo laminar, a contaminação ambiental é mínima. Portanto, o risco para os trabalhadores de contaminação com o animal infectado será minimizado. Os pesquisadores autorizados envolvidos na manipulação dos animais são treinados e somente os mesmos têm acesso permitido ao laboratório de Vacinômica. Estes pesquisadores são vacinados com BCG e uma vez por ano são submetidos ao teste de PPD ou Prova tuberculínica para avaliar se houve ou não contaminação pelo agente infeccioso. Indivíduos cujo PPD for positivo, antes do trabalho no referido laboratório serão encaminhados uma vez por ano ao Hospital das Clínicas, Departamento de Clínica Médica para realização de exame radiológico pulmonar e acompanhamento pelo setor de Tisiologia. Para manipulação, transporte e infecção dos animais com *M. tuberculosis*, somente a Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis realizará estas etapas. A mesma foi altamente treinada para tal na Colorado State University, onde passou quatro anos em treinamento e foi recentemente treinada pelo CVMBS do Albert Einstein College of Medicine, New York. O transporte do agente infeccioso do freezer -80°C até o biotério de experimentação será realizado em recipientes específicos. Um recipiente que protege o tubo contendo a bactéria e um segundo recipiente de transporte que protege estes dois tubos, bem como o manipulador. Caso ocorra a queda deste sistema, o agente não é disseminado pelo ambiente, haja vista que ele está protegido por recipientes duplos. Quando da necessidade do transporte deste material infeccioso, calendário apropriado será esquematizado para se evitar o alto fluxo de pessoas nos corredores entre o Laboratório de Bacteriologia Molecular e o biotério e a sala Vacinômica, reduzindo-se os riscos para os transeuntes. Antes de serem infectados com *Mtb*, os animais serão trocados e, após o procedimento de infecção, as gaiolas contendo os camundongos infectados permanecerão dentro do fluxo laminar sob luz ultra-violeta por 15 minutos (ORDWAY & ORME. Animal Models of Mycobacteria Infection. Current Protocols in Immunology, 2011. DOI: 10.1002/0471142735.im1905s94. Item 25), de acordo com protocolo já estabelecido na literatura para infecção de camundongos com micobactérias. Decorrido este prazo, os animais serão fechados nos isoladores, e estes serão descontaminados externamente com solução de hipoclorito a 10% e transferidos para as estantes ventiladas. Os animais permanecerão nas estantes sem manipulação até a próxima troca (serão apenas observados externamente) que ocorrerá em intervalos de uma semana.

A água, os alimentos oferecidos aos animais infectados, a maravalha e todo e qualquer material utilizado na manipulação dos animais passarão por processo de autoclavação antes de serem descartados.

O trabalho com os camundongos sempre oferece risco aos pesquisadores/alunos e, em caso de mordedura por esses animais, é de conhecimento de todos que se deve lavar e desinfetar o local e relatar o ocorrido aos responsáveis pelo biotério, bem como anotar o caso no livro de ocorrências.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Existe a possibilidade de risco psicológico traumático aos pesquisadores que realizarão a eutanásia. Contudo, o pessoal autorizado para trabalhar nesta sala foi previamente treinado minimizando, portanto os riscos dessa ordem.

- ❑ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa: Piloto:** O estudo será realizado utilizando 32 camundongos isogênicos da linhagem C57BL6, machos com idade de 4 semanas, provenientes do Biotério do CEMIB UNICAMP- Campinas, São Paulo, que serão distribuídos ao acaso em grupos de quatro animais, em gaiolas com água ad libitum. Grupo Controle Magro (n=6): camundongos receberão dieta padrão balanceada Nuvilab; Grupo Controle Obeso (n=6) camundongos receberão dieta hiperlipídica para indução da obesidade; Grupo Magro + BCG (n=6): camundongos receberão dieta padrão balanceada Nuvilab e serão vacinados com BCG; Grupo Obeso + BCG (n=6) camundongos receberão dieta hiperlipídica para indução da obesidade e serão vacinados com BCG; Grupo Magro + BCG + ECMX(n=4): camundongos receberão dieta padrão balanceada Nuvilab e serão vacinados com BCG e posterior booster com ECMX; Grupo Obeso + ECMX (n=4) camundongos receberão dieta hiperlipídica para indução da obesidade e serão vacinados com BCG e posterior booster com ECMX. Todos os animais serão vacinados com BCG ou solução salina, então a indução da obesidade será realizada por 8 semanas. Após a indução da obesidade e diabetes os grupos ECMX receberam booster com a proteína via subcutânea. Ao final do esquema, todos os grupos serão infectados com Mtb por via intravenosa. Coletas de sangue se darão a cada duas semanas do decorrer do esquema. Trinta dias após a infecção, os animais serão eutanasiados para coleta dos órgãos. Serão avaliados os parâmetros alterações teciduais e celulares no pulmão, fígado, baço e tecido adiposo, número de unidades formadoras de colônia (UFC), produção de citocinas por células pulmonares e parâmetros bioquímicos.

Experimento: O estudo será realizado utilizando 32 camundongos isogênicos da linhagem C57BL6, machos com idade de 4 semanas, provenientes do Biotério do CEMIB UNICAMP- Campinas, São Paulo, que serão distribuídos ao acaso em grupos de quatro animais, em gaiolas com água ad libitum. Grupo Controle Magro (n=4): camundongos receberão dieta padrão balanceada Nuvilab; Grupo Controle Obeso (n=4) camundongos receberão dieta hiperlipídica para indução da obesidade; Grupo Controle Aloxana (n=4) camundongos receberão injeção de aloxana intraperitoneal para indução de diabetes. Grupo Magro + BCG (n=4): camundongos receberão dieta padrão balanceada Nuvilab e serão vacinados com BCG; Grupo Obeso + BCG (n=4) camundongos receberão dieta hiperlipídica para indução da obesidade e serão vacinados com BCG; Grupo Aloxana + BCG (n=4) camundongos receberão injeção de aloxana intraperitoneal para indução de diabetes e serão vacinados com BCG. Grupo Magro + BCG + ECMX(n=4): camundongos receberão dieta padrão balanceada Nuvilab e serão vacinados com BCG e posterior booster com ECMX; Grupo Obeso + BCG + ECMX (n=4) camundongos receberão dieta hiperlipídica para indução da obesidade e serão vacinados com BCG e posterior booster com ECMX; Grupo Aloxana + BCG + ECMX (n=4) camundongos receberão injeção de aloxana intraperitoneal para indução de diabetes e serão vacinados com BCG e posterior booster com ECMX. A indução da obesidade será realizada por 8 semanas. Todos os animais serão vacinados com BCG ou solução salina, então indução da obesidade e diabetes será realizada por 8 semanas, a injeção de aloxana será feita na última semana de indução da obesidade nos demais grupos, para que todos terminem o esquema juntos. Ao final

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



do esquema, todos os grupos serão infectados com Mtb por via intravenosa. Coletas de sangue se darão a cada duas semanas do decorrer do esquema. Trinta dias após a infecção, os animais serão eutanasiados para coleta dos órgãos. Para reprodutibilidade dos dados os experimentos serão repetidos três vezes. Serão avaliados os parâmetros alterações teciduais e celulares no pulmão, fígado, baço e tecido adiposo, número de unidades formadoras de colônia (UFC), produção de citocinas por células pulmonares e parâmetros bioquímicos.

- ❑ **Grau de invasividade:** 2
- ❑ **Material foi obtido ou será utilizado em outros projetos (informar protocolo CEUA quando houver):** Não
- ❑ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa (Pontos Finais Humanitários):** Segundo os autores os animais serão observados diariamente após a infecção para avaliar qualquer sinal de mudança comportamental que reflitam dor ou sofrimento do animal. Independentemente do tempo experimental, os animais identificados nessas situações serão eutanasiados e utilizados para estimar a virulência do isolado clínico. O piloto experimental determinará as condições ideais da pesquisa necessárias para manter o bem-estar dos animais utilizados. Os animais serão mantidos e manejados de acordo com os critérios do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA). Os animais permanecerão em microisoladores que propiciam um ambiente livre de patógenos, com água e ração ad libitum. Adicionalmente, estes microisoladores são acoplados a cabines reguladas para gerar um ambiente/habitat com condições que mimetizam o natural destes animais. Todos os procedimentos invasivos bem como a eutanásia dos animais serão realizados ao final do experimento para coleta de órgãos e posterior análise dos mesmos. Os animais serão eutanasiados por meio de deslocamento cervical, procedimento que será realizado por pessoal treinado, minimizando qualquer dor e sofrimento dos mesmos.
- ❑ **Método de eutanásia:** Deslocamento Cervical.
- ❑ **Destino do animal:** Enviado para incineração após autoclavagem e congelamento em freezer -20°C.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ❑ **Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG:** Estão de acordo com as exigências da CEUA.
- ❑ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Não foram encontradas questões que indiquem falta de cuidado com o bem-estar dos animais e também com os pesquisadores. Os pesquisadores precisam corrigir, não existe o Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA) e sim o Conselho de Controle na Experimentação Animal (CONCEA).

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Goiás.

VII - Data da reunião: 20/08/2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "**Impacto da obesidade sobre efeito protetor e resposta imune induzida por vacinação com BCG e ECMX**", registrada com o protocolo nº **040/2018**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 20/08/2018.

- ☐ Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- ☐ Vigência da autorização (início e fim): 01/10/2018 até 01/10/2022.
- ☐ Espécie/linhagem/raça: Camundongos C57BL/6
- ☐ Nº de animais autorizados: 64.
- ☐ Peso/Idade: 20 gramas
- ☐ Sexo: Macho
- ☐ Origem (fornecedor): Biotério do CEMIB UNICAMP- Campinas, São Paulo.


Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com