






Universitat Autònoma de Barcelona

**FACTORES QUE MODIFICAN EL DESARROLLO Y  
LA PROGRESIÓN DE LA TUBERCULOSIS:  
OBESIDAD, MULTIINFECCIÓN Y CORDING**

**Lilibeth Arias de la Cruz**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

FACTORES QUE MODIFICAN EL DESARROLLO Y  
LA PROGRESIÓN DE LA TUBERCULOSIS:  
OBESIDAD, MULTIINFECCIÓN Y *CORDING*



Lilibeth Arias de la Cruz

Tesis doctoral - 2019



Programa de Doctorado en Microbiología  
Departamento de Genética y de Microbiología  
Universitat Autònoma de Barcelona  
2019

## **Factores que modifican el desarrollo y la progresión de la tuberculosis: obesidad, multiinfección y *cording***

Lilibeth Arias de la Cruz

Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP)  
Unitat de Tuberculosi Experimental (UTE)

Tesis para la obtención del grado de Doctora en Microbiología por la  
Universitat Autònoma de Barcelona

Prof. Pere-Joan Cardona i Iglesias  
(Codirector y tutor)

Dra. Cristina Vilaplana i Massaguer  
(Codirectora)



Horizon2020  
European Union Funding  
for Research & Innovation





*Todo soñador tiene asegurada una porción de felicidad*

*-José Narosky-*



# AGRADECIMIENTOS

This project has received funding from the *European Union's Horizon 2020 research and innovation programme* under grant agreement N° 643381.

Primero de todo, gracias mama. Me faltan palabras, líneas y hojas para agradecerte todo lo que haces por mi día a día, eres la persona más fuerte del mundo. También a ti, Adri, por estar a mi lado incondicionalmente y aguantar en las buenas (pero, sobre todo, en las no tan buenas) con muchos abrazos y pocas palabras. Y a vosotras, Marina, Yaiza, Irene, Sara y Alba, por las inestimables horas de charla y porqué habéis sabido darle luz a mi cabeza en los momentos más oscuros.

Agrair-vos a vosaltres també, Pere-Joan i Cris, per donar-me l'oportunitat de formar part de la UTE. I a tu, Cris, per les hores (mai pagades) de teràpia incansable. A la Marta i la Maria Rosa, que vau fer que aterrés a l'IGTP per primer cop. Mil gràcies a tots quatre!

A Paula y a Gemma por haber sido un motor de inicio a fin. Y por aguantarme y rebajar mi histerismo a base de alfajores y chocolate. Gracias por tanto.

A todos los del IGTP que habéis contribuido a amenizar este camino en algún momento u otro. Vio y Eli, en estos últimos meses, los momentos y las risas con vosotras me han dado la vida. Marta, Laura, Érica, Yaiza, Lucía, Arce, Marte, Meri, Maribel, Emi, Alhelí, Esther, Jorge, Marta, Susana, Núria... Gracias.

A toda la gente del IBV, por acogerme como una más des del primer día y porqué me hicisteis sentir como en casa.

No m'oblido de "les Feres". Amb vosaltres vaig començar a fer això anomenat ciència i he après que, per molt lluny que estiguin els nostres camins, sempre ens quedaran el Fru, les imitacions de la Lúdia, l'amor d'en Nacho, els viatges de la Mireia, la boda de la Laura, la inesgotabilitat de la Inma, les flasqueries de l'Edu, els problemes de la Helen, la felicitat de la Txell, el Nobel de l'Albert i les bombes de fum de la Sílvia.

Y a todos los que me rodeáis día a día: amigos, familia, Encarna y Susana. De nuevo, gracias.





# ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	13
ABREVIACIONES.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA .....	19
1.2. GENERALIDADES DE LA TB: TIPOS, TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO.....	19
1.2.1. TRATAMIENTO .....	21
1.2.2. DIAGNÓSTICO .....	22
1.3. RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A LA INFECCIÓN POR <i>MTB</i> .....	23
1.4. VACUNACIÓN CONTRA TB.....	25
1.5. MODELOS ANIMALES .....	29
1.5.1. MODELO MURINO: C3HeB/FeJ .....	31
1.6. FACTORES RELACIONADOS CON EL HUÉSPED.....	33
1.6.1. COMORBILIDADES.....	33
1.6.2. MICROBIOTA INTESTINAL .....	35
1.7. FACTORES AMBIENTALES: INFECCIÓN ÚNICA VS MÚLTIPLE.....	38
1.8. FACTORES RELACIONADOS CON EL PATÓGENO: <i>CORDING</i> .....	39
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
3.1. ÉTICA Y ANIMALES .....	49
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	50
3.2.1. ESTUDIO I.....	50
3.2.2. ESTUDIO II.....	53
3.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS .....	55
3.4. BL.....	55
3.5. PATOLOGÍA PULMONAR .....	56
3.6. SUPERVIVENCIA .....	56
3.7. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA.....	56
3.8. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	57
3.8.1. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE ADN .....	57
3.8.2. SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S rRNA .....	57
3.9. ANÁLISIS DE LOS AGREGADOS DE BACTERIA.....	58
3.10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	59

3.11.	ESTADÍSTICA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS .....	60
3.11.1.	ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA.....	60
3.11.2.	ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA .....	61
4.	RESULTADOS (ESTUDIO I).....	63
4.1.	INDUCCIÓN DE LA OBESIDAD.....	65
4.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA VACUNACIÓN CON BCG.....	66
4.2.1.	PESO .....	66
4.2.2.	BL.....	68
4.2.3.	PATOLOGÍA PULMONAR .....	68
4.2.4.	SUPERVIVENCIA .....	72
4.3.	EFFECTO DE LA DIETA EN EL DESARROLLO DE LA TB .....	73
4.3.1.	PESO .....	73
4.3.2.	BL.....	74
4.3.3.	PATOLOGÍA PULMONAR .....	74
4.3.4.	SUPERVIVENCIA .....	76
4.4.	ANÁLISIS DEL TIPO DE INFECCIÓN EN EL DESARROLLO DE LA TB .....	76
4.4.1.	PESO .....	77
4.4.2.	BL.....	78
4.4.3.	PATOLOGÍA PULMONAR .....	78
4.4.4.	SUPERVIVENCIA .....	79
4.5.	ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA CON NI.....	79
4.6.	RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL EXPERIMENTO 1 .....	81
4.7.	ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL .....	84
4.7.1.	EXPERIMENTO 1 .....	85
4.7.2.	EXPERIMENTO 2 .....	91
5.	RESULTADOS (ESTUDIO II) .....	95
5.1.	ANÁLISIS DE LOS AGREGADOS DE BACTERIA .....	97
5.2.	BL .....	98
5.2.1.	EXPERIMENTO 1 .....	98
5.2.2.	EXPERIMENTO 2 .....	99
5.2.3.	EXPERIMENTO 3 .....	99
5.3.	PATOLOGÍA PULMONAR .....	100
5.3.1.	EXPERIMENTO 1 .....	100
5.3.2.	EXPERIMENTO 2 .....	100
5.3.3.	EXPERIMENTO 3 .....	101
5.4.	ANÁLISIS INMUNOLÓGICO.....	103
5.4.1.	EXPERIMENTO 2 .....	103
5.4.2.	EXPERIMENTO 3 .....	104
5.5.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	108
6.	DISCUSIÓN.....	109
7.	CONCLUSIONES .....	123

<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>127</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>143</b>



## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Esta enfermedad se encuentra entre las 10 mayores causas de muerte y se estima que un cuarto de la población mundial se encuentra infectada por *Mtb*. No todos los individuos infectados por el bacilo desarrollarán la enfermedad a lo largo de su vida, pero esta probabilidad incrementa en presencia de factores relacionados con el huésped, ambientales y del patógeno. Entre los factores relacionados con el huésped, se encuentran las comorbilidades: la diabetes y otras patologías relacionadas, como la obesidad y el síndrome metabólico. La única vacuna disponible contra la TB es la Bacillus Calmette-Guérin (BCG), la cual presenta una efectividad variable contra las formas adultas de TB pulmonar. En la actualidad, un importante campo de estudio es la búsqueda de modelos animales que mimeticen las situaciones en las que se da la TB en humanos, en los que testar nuevos candidatos a vacuna, y que ayuden a prevenir futuros fracasos en la fase clínica del desarrollo de los mismos. Con esta finalidad, en el presente proyecto hemos desarrollado un modelo de comorbilidad de obesidad-TB en la cepa de ratón C3HeB/FeJ, en el que se ha observado una protección variable de la BCG con una incapacidad en la reducción de la supervivencia y la carga bacilar pulmonar en condiciones de obesidad. Además, en los animales bajo esta condición se ha observado una reducción de la diversidad de la microbiota intestinal y un aumento de patrón proinflamatorio del sistema inmune. Estos resultados podrían explicar la variabilidad de protección que presenta la BCG. Además, también se ha estudiado el *cording* como factor de riesgo relacionado con el patógeno, observando que éste influye en la capacidad infectiva de la bacteria y la progresión de la TB. Con este estudio se abren nuevos caminos en el ámbito del desarrollo y evaluación de nuevos candidatos a vacuna en estado preclínico, y se ha demostrado que existen diversos factores a tener en cuenta a la hora de desarrollar un modelo real y fiable para el estudio de la TB.



# ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). TB is among the top 10 leading causes of death and it is estimated that a quarter of the world's population is infected with *Mtb*. Not all individuals infected with the bacillus will develop the disease throughout their life, but this probability increases in the presence of factors related to the host, environmental and also the pathogen. Among the factors related to the host we found comorbidities: diabetes and other related pathologies, such as obesity and metabolic syndrome. The only vaccine available against TB is Bacillus Calmette-Guérin (BCG), which presents a variable protection against adult forms of pulmonary TB. Currently, an important field of study is the search for animal models that mimic the situations in which TB occurs in humans, in which to test new vaccine candidates, and that help prevent future failures of them in the clinical phase of development. For this purpose, in the present project we have developed a model of obesity-TB comorbidity in the C3HeB/FeJ mouse strain, in which a variable BCG protection has been observed with an incapacity in the reduction of survival and pulmonary bacillary load in obesity conditions. In addition, in animals under this condition, a reduction in gut microbiota and an increase in the pro-inflammatory pattern of the immune system have been observed. These results could explain the variability of protection showed with BCG vaccination. In addition, cording formation has also been studied as a risk factor related to the pathogen, noting that it influences the infective capacity of the bacteria and the progression of TB. This study opens new insights in the field of development and evaluation of new vaccine candidates in a preclinical state, and it has been shown that there are several factors to consider when developing a trustworthy model for the study of TB.





# ABREVIACIONES

BL	Carga bacilar, del inglés <i>bacillary load</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BMI	Índice de masa corporal, del inglés <i>body mass index</i>
CD	Células dendríticas
CFU	Unidades formadoras de colonias, del inglés <i>colony forming units</i>
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
HFD	Dieta alta en grasas, del inglés <i>high fat diet</i>
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IGRA	Ensayo de liberación de interferón gamma, del inglés <i>interferón gamma release assay</i>
IL	Interleucina
LDA	Dosis baja de aerosol, del inglés <i>low dose aerosol</i>
LTBI	Infección tuberculosa latente, del inglés <i>latent tuberculosis infection</i>
i.v.	Intravenosa
MA	Macrófagos alveolares
MCI	Infecciones múltiples consecutivas, del inglés <i>multiple consecutive infections</i>
MDR	Multirresistente, del inglés <i>multidrug-resistant</i>
MST	Tiempo medio de supervivencia, del inglés <i>median survival time</i>
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ND	Dieta normal, del inglés <i>normal diet</i>
NHP	Primates no humanos, del inglés <i>non-human primates</i>
NI	Inmunidad natural, del inglés <i>natural immunity</i>

NMDS	Escalamiento multidimensional no métrico, del inglés <i>non-metric multidimensional scaling</i>
OGTT	Prueba de tolerancia oral a la glucosa, del inglés <i>oral glucose tolerance test</i>
OTUs	Unidades taxonómicas operativas, del inglés <i>operational taxonomic units</i>
PCA	Análisis de componentes principales, del inglés <i>principal component analysis</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
p.i.	Posinfección
Ratio F/B	Ratio Firmicutes/Bacteroidetes
rBCG	BCG recombinante, del inglés <i>recombinant BCG</i>
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta, del inglés <i>short-chain fatty acids</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido, del inglés <i>scanning electron microscopy</i>
SI	Infección única, del inglés <i>single infection</i>
TB	Tuberculosis
TDM	Dimicolato de trehalosa
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
Th	T colaboradora, del inglés <i>T helper</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	T reguladora
TST	Prueba de la tuberculina, del inglés <i>tuberculin skin test</i>
WHO	Organización Mundial de la Salud, del inglés <i>World Health Organization</i>
XDR	Extensamente resistente, del inglés <i>extensively drug-resistant</i>

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. Definición y epidemiología

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, transmitida por el aire y causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). El bacilo causante de la TB fue descubierto por el Dr. Robert Koch en 1882 (1).

La TB se encuentra entre una de las 10 mayores causas de mortalidad en el mundo y es la primera causa de mortalidad debida a un único agente infeccioso, por encima del VIH/SIDA. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*), en 2017 murieron 1,3 millones de personas por TB y 10 millones de personas desarrollaron la enfermedad. Se estima que 1,7 mil millones se encuentran infectados por *Mtb*, de las cuales entre un 5-10% desarrollarán la enfermedad durante su vida (2).

Debido a estos impactantes números, la WHO ha planteado una estrategia a nivel global para acabar con la epidemia de TB basada en una reducción del 95% del número de muertes por TB, una reducción del 90% de la incidencia de TB y la reducción a cero del número de familias afectadas por TB que tengan que hacer frente a los costes relacionados con la enfermedad, y todo ello para el 2035 (2). Para lograr este objetivo, los puntos clave a abordar son: la prevención, la disponibilidad de recursos para abordar la enfermedad y la investigación e innovación.

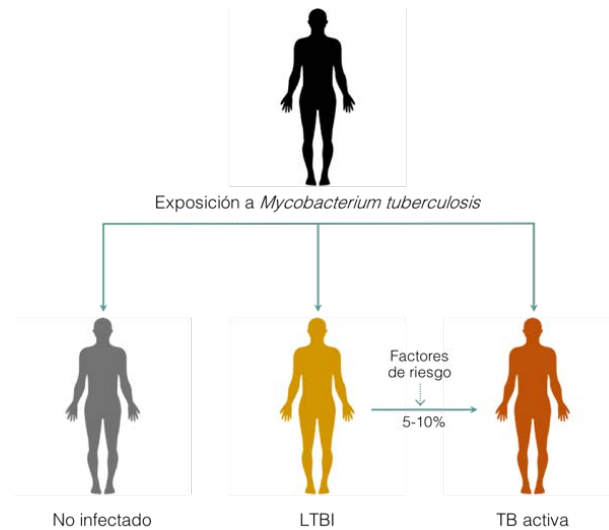
## 1.2. Generalidades de la TB: tipos, tratamiento y diagnóstico

El bacilo *Mtb* es transportado en partículas de aerosol generadas por personas con TB pulmonar cuando hablan, tosen, estornudan, gritan o cantan. La transmisión de la infección ocurre cuando otra persona inhala partículas que contienen el bacilo y éstas consiguen llegar a los alvéolos pulmonares. En la probabilidad de la transmisión influyen diversos factores: la susceptibilidad del huésped, relacionada con el sistema inmunológico; la infectividad, relacionada con el número de bacilos expulsados; la

exposición, relacionada con la duración de la exposición; y factores ambientales, relacionados con el espacio o la ventilación, entre otros (3).

Como la vía de entrada de *Mtb* es el tracto respiratorio, la infección primaria se establece principalmente en los pulmones, y en específico en la parte inferior de éstos. La bacteria se puede reproducir en este lugar, dando lugar a la TB pulmonar y/o propagarse por la vía linfático-hematógena pudiendo darse una reactivación de la bacteria en múltiples órganos: ganglios linfáticos, cerebro, articulaciones y huesos, sistema genito-urinario, abdomen, pleura, piel, meninges, entre otros, y dando a lugar a distintos tipos de TB extrapulmonar (4–6). Los síntomas clásicos de la TB pulmonar incluyen tos crónica, debilidad, fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso y apetito, producción de esputo y hemoptisis. La TB extrapulmonar presenta varias manifestaciones clínicas ya que puede afectar a un amplio rango de órganos, lo cual hace que el diagnóstico requiera un alto índice de sospecha clínica (7,8).

Tras la exposición a la bacteria, pueden darse 3 situaciones. La primera es la que sucede en las personas que, pese a haber estado expuestos a *Mtb*, son capaces de eliminar la bacteria. Estos individuos nunca desarrollan la enfermedad y, quizás que no se infectan, debido a una inmunidad innata protectora. Por otro lado, encontramos individuos en los que la inmunidad innata no es capaz de proteger contra la infección, pero el sistema inmune adaptativo consigue parar el crecimiento inicial de la bacteria. Esta situación es la que se conoce como infección por tuberculosis latente (LTBI, del inglés *latent tuberculosis infection*), donde los individuos permanecen infectados de forma latente, asintomática y sin evidencia clínica de la enfermedad. Estos casos son susceptibles a que se produzca una reactivación de la bacteria, dando a lugar a la TB posprimaria. Finalmente encontramos los casos de TB activa, los cuales presentan sintomatología y pueden provenir de una infección primaria, en los que el sistema inmune adaptativo no es capaz de controlar la replicación de la bacteria inicial, o de individuos con LTBI. Se estima que entre un 5-10% de ellos desarrollarán enfermedad activa (**Figura 1**) (9,10).



**Figura 1. Posibles situaciones como consecuencia de la exposición a *Mtb*.**

Éstos son parámetros y formas mundialmente reconocidas pero hoy en día se considera que la patología clásicamente relacionada con TB no se puede explicar y/o clasificar por medio de los estados “no infectado”, “infectado” o “enfermo”, ya que existe un gran abanico de lesiones en un mismo huésped con tiempos de evolución diferentes (11). Pese a todo, se desconocen los mecanismos exactos del huésped que hacen que un individuo esté protegido contra *Mtb* y otro desarrolle la enfermedad. Por otro lado, existen diversos factores de riesgo que influyen en el proceso de reactivación, como la infección con VIH, el contacto cercano con una persona con TB, la silicosis, el tratamiento con factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) o la diabetes mellitus (DM), entre otros (12).

### 1.2.1. Tratamiento

El tratamiento de la TB es complejo, ya que requiere de la administración de múltiples fármacos durante un largo periodo de tiempo. Esto hace que la adherencia al tratamiento sea baja en muchos casos y éste no se complete (13–15). Según las guías publicadas por la WHO, para los nuevos casos de TB pulmonar se recomienda administrar un régimen de tratamiento antibiótico diario durante 6 meses. Los

primeros 2 meses se recomienda la administración de 4 antibióticos -isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol-, seguido de 4 meses con 2 antibióticos -isoniacida y rifampicina-. Éste es considerado el tratamiento antibiótico de primera línea, que debe ser modificado en casos de TB multirresistente (MDR, del inglés *multidrug-resistant*) o TB extensamente resistente (XDR, del inglés *extensively drug-resistant*), donde se incluyen antibióticos de segunda línea con más efectos adversos y mayor duración del tratamiento (16). Las resistencias se pueden dividir en primaria, cuando el paciente con TB se infecta con una cepa de *Mtb* resistente a uno o diversos fármacos; o secundaria o adquirida, que se da cuando los mutantes resistentes en una población inicial son seleccionados fruto de un uso inapropiado de los antibióticos inicialmente prescritos (17,18).

### 1.2.2. Diagnóstico

Debemos distinguir entre el diagnóstico de LTBI y el de TB activa. En el caso de la LTBI, donde la bacteria se encuentra en estado inactivo o durmiente, el diagnóstico se basa en la detección de respuesta frente a la bacteria mediante la prueba de la tuberculina (TST, del inglés *tuberculin skin test*) y el ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA, del inglés *interferon gamma release assay*). Diversas guías recomiendan el cribado mediante el uso de ambas técnicas en determinados grupos de edad y riesgo; sin embargo, la TST resulta la técnica de elección en países con pocos recursos debido a su bajo coste. Además, la TST presenta una sensibilidad igual al IGRA pero una menor especificidad (8,13,19).

Por otro lado, el método estándar de diagnóstico de la TB activa (pulmonar) incluye técnicas radiológicas, examinación microscópica y cultivo en medio líquido de muestras de esputo (13). Sin embargo, el diagnóstico de TB resulta complicado en situaciones como la TB extrapulmonar, la etapa temprana de la enfermedad, la coinfección con VIH, la TB en la infancia y la TB MDR (20). El diagnóstico principal y definitivo es la detección del bacilo en muestras de un paciente sintomático. En

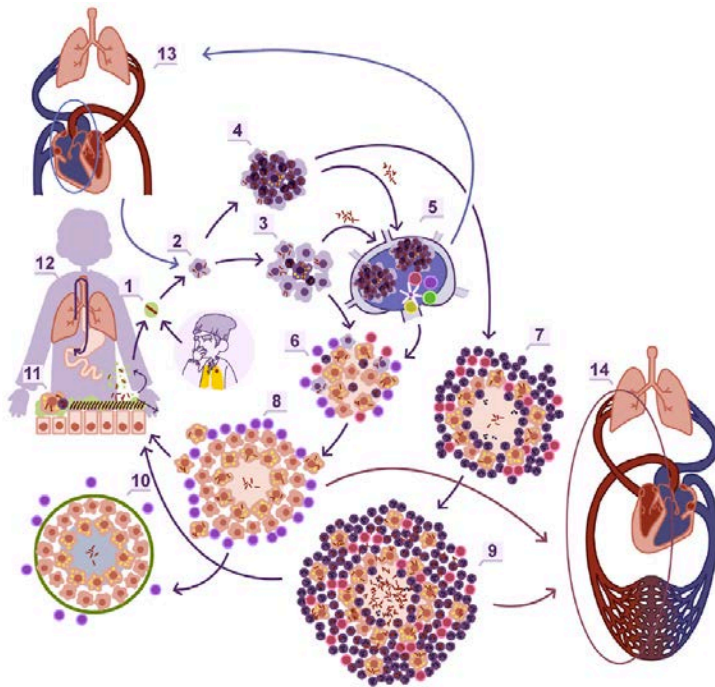


casos de TB extrapulmonar se puede requerir de técnicas invasivas con el fin de conseguir la muestra.

### 1.3. Respuesta inmunológica frente a la infección por *Mtb*

El ciclo de la infección por *Mtb* se esquematiza en la **Figura 2**. La infección por *Mtb* comienza con la entrada de la bacteria vía aérea y el encuentro con macrófagos alveolares (MA), neutrófilos y células dendríticas (CD), la primera línea de defensa del huésped. Los MA reconocen la bacteria gracias a receptores de reconocimiento de patrones. Variaciones en genes que codifican para estos receptores y moléculas implicadas en la cascada de señalización, pueden influir en la susceptibilidad y severidad de la TB. Una vez *Mtb* se encuentra dentro de los MA, éste se convierte el primer lugar de replicación de la bacteria inhibiendo su destrucción por parte de los MA (9,21). También se produce el reclutamiento de otras células de linaje mieloide, que cuando fallan en la contención de la bacteria, permiten la replicación de ésta de forma extracelular (22,23). La activación de los MA y neutrófilos limitando la replicación y/o destruyendo la bacteria a través de los sistemas inmunes innato y adaptativo, son determinantes para desencadenar toda la respuesta inmunológica contra *Mtb*.

Los MA infectados secretan diversas citoquinas, como interleucina (IL)-12 e IL-18, las cuales estimularán a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La subpoblación específica estimulada es la T colaboradora (Th, del inglés *T helper*)-1, la cual secretará interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (24). La producción de esta citoquina resulta indispensable para el control de la infección por *Mtb* por diversas vías. Por un lado, estimula la producción de TNF $\alpha$  por parte de los MA, factor que participará a su vez en la formación y mantenimiento del granuloma, en la inducción de la producción de citoquinas y en el control de la propagación de la infección. Además, IFN $\gamma$  participa en la maduración del fagosoma que contiene la bacteria aumentando su acidificación y la destrucción de *Mtb* (25–27).



**Figura 2. Ciclo infeccioso por *Mtb*.** Las partículas de aerosol que contienen los bacilos entran al alvéolo pulmonar (1), donde infectan MA y se produce la replicación de la bacteria (2). A continuación, se produce la necrosis del MA infectado, lo que produce la infección de otros MA y la activación de dos respuestas inmunitarias dominada por monocitos (3) o por neutrófilos (4). Los bacilos son drenados vía linfática (5) y permitiendo la diseminación hematogena de la bacteria (13). Dependiendo de la respuesta inmunitaria que se desencadene, Th1 (6) o Th17 (7), se forman distintos tipos de granuloma. En el primer caso hay un control de la población bacilar con destrucción de la mayoría de bacilos (8), y un control del granuloma mediante la encapsulación (10). En el segundo caso, existe una infiltración neutrofílica, las lesiones crecen de tamaño y la concentración de bacilos es más elevada (9). La bacteria puede ser drenada a través del fluido alveolar (11) hacia el trato gastrointestinal (12) o puede generar nuevos aerosoles (1). Extraída de (28).

Los bacilos viajan a los ganglios linfáticos del pulmón, donde al ser fagocitados por las CD activan las respuestas Th1, Th2, Th17 y T reguladora (Treg), y en menor medida la de las células T CD8<sup>+</sup> (28–31). El mayor problema de esta respuesta no es su eficiencia, sino el tiempo que tardan en producirse y acumularse las suficientes células T específicas. Mientras tanto, la bacteria ha tenido el suficiente tiempo para reproducirse y definir la lesión pulmonar (32).

El granuloma es el sello identificativo de la respuesta del huésped contra la infección por *Mtb*. Toda la respuesta inmunitaria orquestada por los diferentes actores va en

dirección a la formación de esta estructura. Para la formación del granuloma es necesaria la llegada del bacilo a la zona intersticial del pulmón para desencadenar la inflamación local, la atracción de MA y DC -que a su vez amplificarán la respuesta- y finalmente la atracción de más células, como MA, neutrófilos y células T  $\gamma\delta$ , mediante la producción de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-17) (33,34).

La formación del granuloma es dependiente de TNF $\alpha$ , producida tanto por los macrófagos infectados como por las células T activadas. Es necesaria una señalización de TNF $\alpha$  continua para mantener concentraciones elevadas de quimiocinas para el reclutamiento y mantenimiento de las células en el granuloma (29). El tipo de granuloma que se forme dependerá de la respuesta inmunológica que se genere. El granuloma de tipo proliferativo contiene células epitelioides y fibroblastos, una baja carga bacilar y progresará hacia la calcificación de la lesión. Por el contrario, las lesiones exudativas contienen grandes acúmulos de neutrófilos y una gran carga bacilar. Este tipo de lesiones favorecen la diseminación broncogena y producen una gran necrosis central favoreciendo la licuefacción y la cavitación de la lesión (35–37).

Pese a que es necesaria una correcta activación del sistema inmunológico, una respuesta inflamatoria excesiva puede ser perjudicial para el huésped. En general, la respuesta proinflamatoria está compensada por la respuesta de las células Treg, IL-10, factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) y prostaglandina E2 (PGE $_2$ ). En el caso particular de los neutrófilos, que participan inicialmente en la contención de la bacteria, un exceso de respuesta largo plazo se encuentra asociado a una pobre capacidad en la contención de la micobacteria (34,38,39).

#### 1.4. Vacunación contra TB

La vacuna ideal contra la TB debería prevenir la infección por *Mtb*, la enfermedad primaria y la reactivación, tanto en huéspedes sanos como en población vulnerable (40). Lamentablemente, la situación actual se encuentra muy alejada de ser la ideal.

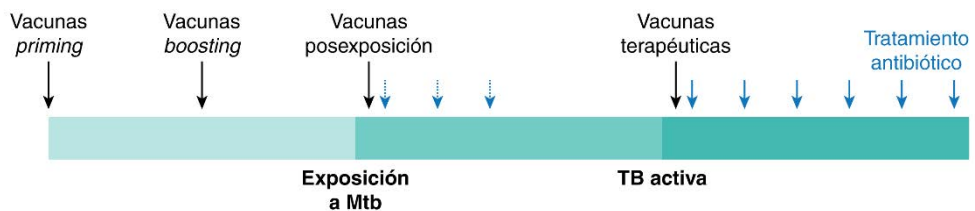
La única vacuna disponible, e incluida en el programa de vacunación recomendado por la WHO en países con alta carga de TB, es la Bacillus Calmette-Guérin (BCG). La BCG fue desarrollada en 1921 por Albert Calmette y Camille Guérin. Es una vacuna viva atenuada, proveniente de una cepa de *Mycobacterium bovis*, y es considerada la vacuna más utilizada de la historia (40).

Su mayor protección contra la TB se encuentra relacionada con la prevención de la TB en niños, especialmente la TB extrapulmonar meníngea (41,42). En cambio, la protección frente a las formas respiratorias de TB en adultos es muy variable. Esta variabilidad en su capacidad de protección ha sido relacionada con factores ambientales y de la genética del huésped, pero realmente se desconoce el motivo exacto. También se ha relacionado con el uso de diferentes cepas de BCG, aunque todas ellas deriven de la cepa Calmette-Guérin (Behr, 2002; Mangtani *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2016)

Debido a la variable eficacia de la BCG en adultos, además de la lenta disminución de la incidencia de la TB y al aumento de las formas resistentes y multirresistentes, existe una necesidad imperiosa de desarrollar nuevos candidatos a vacuna contra la TB. Para ello deben integrarse diversos campos de estudio como la historia natural de la TB, nuevos datos sobre la inmunología de la infección y la inmunología de la inmunización contra *Mtb*, el papel de las micobacterias no tuberculosas, profundizar en el mecanismo de acción de la BCG, técnicas moleculares para la identificación de antígenos inmunodominantes de *Mtb* y nuevos métodos para la liberación de antígenos (40).

Los candidatos a vacuna contra la TB siguen diferentes estrategias de inmunización y utilizan vectores virales, vacunas de subunidades adyuvadas, BCG recombinantes y fragmentos o microorganismos completos inactivados mediante procesos físicos o químicos. En primer lugar, tenemos las vacunas *priming*, que son aquellas que tienen como objetivo reemplazar la BCG proporcionando una mayor seguridad y protección. En segundo lugar, encontramos las vacunas *prime-boost*, que tienen como

objetivos potenciar la limitación de la inmunidad de la BCG e incluso potenciar antígenos específicos de las vacunas *priming*. Las vacunas basadas en estos dos tipos de estrategia son las vacunas profilácticas o de preexposición, que son administradas con la finalidad de prevenir la infección por *Mtb*. Las vacunas de posexposición, en cambio, se administran tanto a individuos infectados por *Mtb* para prevenir el desarrollo de la enfermedad activa, como a individuos con enfermedad clínica en combinación con el tratamiento antibiótico, con el fin de acortar el tiempo de tratamiento de la TB activa. Estas últimas vacunas son las también llamadas vacunas terapéuticas (**Figura 3**) (41,42,46,47). La **Tabla 1** muestra las vacunas contra la TB en fase desarrollo en la actualidad.



**Figura 3.** Esquema de las diferentes estrategias de inmunización de los candidatos a vacuna contra la TB

Estudios epidemiológicos y experimentales en animales sugieren que la infección previa con *Mtb* confiere cierta protección contra la enfermedad consecuencia de la reexposición. No obstante, esta protección es variable y depende de los factores genéticos del huésped que afectan a la susceptibilidad individual a la TB. Este concepto de protección debe tenerse en cuenta en el desarrollo de nuevos candidatos a vacuna (48–51).

Es necesario identificar los límites de la eficacia de nuevas vacunas en el estadio de desarrollo preclínico o en el desarrollo clínico temprano, debido a los escasos recursos económicos disponibles para pruebas clínicas (20). Para ello, es importante desarrollar modelos animales en los que se tengan en cuenta los factores del huésped, los factores ambientales y los factores relacionados con el patógeno.

**Tabla 1. Resumen de los candidatos a vacuna actuales, la estrategia de inmunización que utilizan, cómo están formuladas y la fase del desarrollo en la que se encuentran.** Adaptado de (46,47).

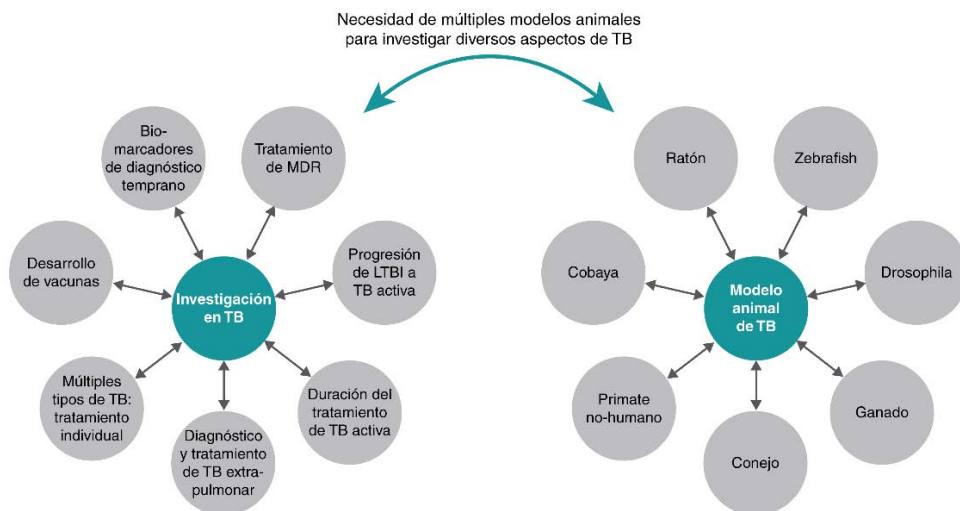
Agente	Estrategia de inmunización	Formulación	Estado de desarrollo
<b>Whole cell viva</b>			
VPM1002	Profiláctica y posexposición	rBCG viva	Fase III
MTBVAC	Profiláctica, posexposición y terapéutica	<i>Mtb</i> viva atenuada	Fase IIa
<b>Whole cell atenuada</b>			
<i>M. vaccae</i>	Terapéutica	<i>Whole-cell M. vaccae</i>	Fase III
MIP	Terapéutica	<i>Whole-cell M. indicus pranii</i>	Fase III
DAR-901	Profiláctica, posexposición y terapéutica	<i>Whole-cell M. obuense</i>	Fase IIb
RUTI	Terapéutica	<i>Mtb</i> fragmentada	Fase IIa
<b>Subunidades de proteínas adyuvadas</b>			
M72/ASO1 <sub>E</sub>	<i>Booster</i> , profiláctica y posexposición	Mtb39A, Mtb32A y ASO1 <sub>E</sub>	Fase IIb
H4:IC31	Profiláctica y posexposición	Ag85B, TB10.4 y IC31	Fase IIb
H56:IC31	Profiláctica, posexposición y terapéutica	Ag85B, ESAT6, Rv2660c y IC31	Fase IIa
ID93+GLA-SE	Profiláctica, posexposición y terapéutica	Rv1813, Rv2608, Rv3619, Rv3620 y GLA-SE	Fase IIa
GamTBvac	Profiláctica	Ag85B, ESAT6-CFP10 y dextran/CpG	Fase I
AEC/BC02	Profiláctica	Ag85B, ESAT6-CFP10 y BC02	Fase I
<b>Vectores virales</b>			
MVA85A (aerosol)	Profiláctica, posexposición y terapéutica	Ag85A y Vaccinia Ankara modificado	Fase II
Ad5Ag85A	Profiláctica y posexposición	Ag85A y adenovirus recombinante serotipo 5	Fase I
ChadOx1.85A+MVA85	Profiláctica	Vector de adenovirus de chimpancé modificado, 85A, y Vaccinia Ankara modificado	Fase I
TB/FLU-04L	Profiláctica	Ag85A, ESAT6 y virus influenza recombinante	Fase I

## 1.5. Modelos animales

Los modelos animales han sido una herramienta fundamental para el estudio de las enfermedades. En el caso de TB, estos modelos han sido utilizados para la búsqueda de una vacuna que presente una protección mayor a la que ofrece la BCG.

Además, estos modelos son imprescindibles para conocer qué mecanismos utiliza *Mtb* para desarrollar la enfermedad, los cuales aún no están realmente claros. El concepto de un solo modelo animal para el conocimiento y estudio de la TB es erróneo para esta enfermedad, ya que presenta múltiples tipos y formatos.

Son necesarios diversos modelos animales que nos den información de los distintos procesos y de cada uno de ellos de manera independiente. La **Figura 4** muestra los principales aspectos de la TB a los que van dirigidos el desarrollo de nuevos modelos animales (52,53).



**Figura 4. La complejidad de TB requiere la existencia de múltiples modelos animales para su estudio. Adaptada de (52) .**

- Búsqueda de biomarcadores específicos que permitan el diagnóstico de la enfermedad en etapas tempranas y la distinción entre LTBI y TB activa.
- Evaluación de vacunas y su protección a largo plazo.

- Nuevos tratamientos antibióticos con menos efectos adversos y que permitan una reducción de la duración del tratamiento.
- Diagnóstico y tratamiento de la TB-MDR.
- Estudio de la LTBI.
- Diagnóstico y tratamiento de la TB extrapulmonar.
- Cobertura de la complejidad en formas y tipos que presenta la TB.

Los animales más utilizados para el estudio de la TB han sido el ratón, la cobaya, el conejo y los primates no humanos (NHP, del inglés *non-human primate*); los cuales han servido para estudiar un parámetro en concreto de la enfermedad: signos clínicos, patología, carga bacilar (BL, del inglés *bacillary load*), progresión de la enfermedad o parámetros inmunológicos (52). Los tres primeros son en los que se ha estudiado de una manera exhaustiva la inmunología relacionada con la TB (54). Otro problema que presenta esta enfermedad es su larga evolución, por lo que son necesarios modelos animales que acorten estos tiempos.

La cobaya, como modelo animal para el estudio de la TB, ha sido utilizada por presentar: una gran reactividad frente a *Mtb*, lesiones secundarias debido a la diseminación por vía hematogena con destrucción de ganglios linfáticos y una evolución progresiva de la patología -muy similar a la del humano- con un desarrollo de una fuerte respuesta granulomatosa que da lugar a una progresión hacia enfermedad severa. Por todo esto, la cobaya ha sido el modelo de elección para la evaluación de nuevos candidatos a vacuna, una vez superado el modelo murino. Además, en este animal se ha desarrollado un modelo de LTBI, administrando un tratamiento antibiótico después de la infección por *Mtb* (53,55–57).

El estudio de TB en NHP, a día de hoy, se considera el modelo más valioso en el desarrollo preclínico de candidatos a vacuna, en cuanto a la información que nos proporciona sobre la enfermedad, debido al estrecho espacio que existe con el humano en términos de evolutivos. El sistema inmune de los NHP es muy similar, por lo que la respuesta frente a TB nos permite establecer un paralelismo con la



observada en humanos. Además, nos permite analizar la evolución de la patología en las diferentes fases de la enfermedad. Por otro lado, resulta el modelo ideal para la evaluación de nuevos candidatos a vacuna antes de entrar a ensayos clínicos. Sin embargo, el bajo uso de este modelo animal es debido al alto coste que suponen tanto la compra como la estabulación, así como el espacio y equipamiento de biocontención necesarios para llevar a cabo este tipo de experimentos (53,58–60). Sin embargo, este modelo carece de septos interlobulares, motivo por el cual no puede desarrollar la encapsulación de los granulomas como en el caso de los mamíferos de gran volumen, como cerdos y vacas, y en los que se incluyen a los humanos (35,61).

### 1.5.1. Modelo murino: C3HeB/FeJ

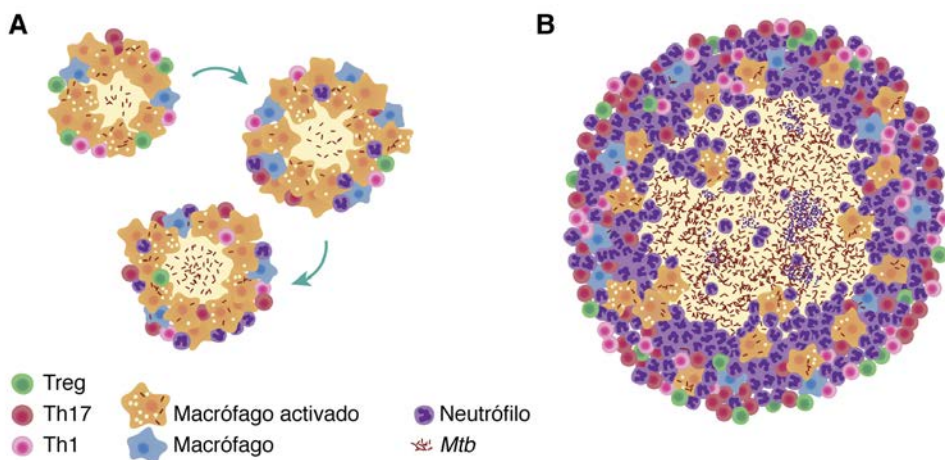
El modelo de ratón ha sido el modelo animal elegido para estudiar la mayoría de los procesos relacionados con la infección por *Mtb* y el desarrollo de la TB. Pese a que los modelos anteriormente descritos puedan ser más útiles para el estudio de diversos aspectos de la patogénesis de la TB, son varios los motivos por los cuales se escoge el modelo murino. Entre ellos encontramos el amplio conocimiento del funcionamiento del sistema inmune, la disponibilidad de reactivos para estudiarlo, el bajo coste que supone el mantenimiento y el estudio con este modelo en comparación a otros animales, y la gran disponibilidad de cepas consanguíneas (54).

No sólo es importante la elección del modelo animal, sino que también es de vital importancia la elección de la cepa más adecuada basado en los factores de sensibilidad o resistencia. Las cepas sensibles a *Mtb* son C3H/HeJ, 129/Sv, DBA/2 o CBA; mientras que entre las resistentes encontramos las cepas C57BL/6 o BALB/c (54).

Otra de las cepas de ratón de elección para el estudio de la TB es la C3HeB/FeJ. Ésta es una de las cepas sensibles a TB, la cual desarrolla varios tipos de lesiones necróticas en el granuloma aunque no crea cavitaciones (62). El hecho de que la patología pulmonar que se desarrolla en esta cepa de ratón es similar a la que se observa en el humano, ha favorecido la elección de la C3HeB/FeJ como modelo *in vivo* para la

evaluación de nuevos candidatos a vacuna (56). A pesar de eso, las diferencias anatómicas del árbol bronquial del ratón hacen que hayan variaciones en la patología que deben tenerse en cuenta (63).

La cepa C3HeB/FeJ no produce un único tipo de granuloma, que comúnmente se entiende como una estructura con agregados de células mieloides con linfocitos periféricos y una capsula fibrosa que separa todo el conjunto de células del sistema inmune del tejido normal adyacente (23). En esta cepa, se producen dos tipos de lesiones: lesiones proliferativas y lesiones exudativas. Las proliferativas son lesiones controladas, no encapsuladas, compuestas por macrófagos espumosos y linfocitos, donde irán apareciendo infiltraciones de neutrófilos a medida que avance la infección. En cambio, las exudativas, se caracterizan por ser lesiones encapsuladas con necrosis caseosa central, rodeada por una cápsula fibrosa de tejido conectivo, y ambas estructuras separadas por una capa de macrófagos espumosos. El tipo celular predominante de este tipo de lesiones son los neutrófilos, lo que induce la licuefacción de las lesiones. Esta licuefacción viene dada por la coalescencia de varias lesiones antes de que se produzca la encapsulación (**Figura 5**) (22,35,62,64,65).



**Figura 5. Tipos de lesiones observadas en el modelo de TB con C3HeB/FeJ: proliferativas (A) y exudativas (B).** Adaptada de (66).

## 1.6. Factores relacionados con el huésped

Los factores relacionados con el huésped y con el desarrollo de la TB son muchos. En este proyecto se analiza la obesidad como comorbilidad relacionada con la TB y el papel de la microbiota intestinal por su directa participación en el desarrollo de la comorbilidad.

### 1.6.1. Comorbilidades

Uno de los problemas principales que presenta la TB es la presentación de la enfermedad junto con otras enfermedades, también conocido como comorbilidad. Las comorbilidades son una de las mayores causas de muerte relacionadas con la TB. Se han realizado estudios de comorbilidades de TB con enfermedades comunicables y no comunicables, entre las que se encuentran el VIH/SIDA, la hepatitis C, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la DM, la malnutrición, el tabaquismo o el abuso de alcohol (67).

Una de las comorbilidades más bien establecidas en TB es la DM. Si bien anteriormente se encontraba relacionada a poblaciones con unas características sociodemográficas distintas a las ligadas con la TB; actualmente, y debido su aumento especialmente en países de Asia como China y la India, el estudio de la comorbilidad DM-TB se ha convertido de vital importancia para el control global de la TB (68). De hecho, varios estudios describen que la presencia de DM incrementa entre dos y tres veces el riesgo de sufrir TB (69,70). El mecanismo por el cual se aumenta el riesgo de TB en presencia de DM no se conoce exactamente, aunque la hiperglicemia produce una alteración en macrófagos y linfocitos, estando estas células directamente relacionadas con la contención de la TB (69).

Los estudios de comorbilidad también evalúan la malnutrición como factor de riesgo, ya que tiene un fuerte impacto en la función de la inmunidad celular, y ésta es uno de los factores claves para la defensa contra la TB (71). Sin embargo, los estudios que analizan la obesidad y el índice de masa corporal (BMI, del inglés *body mass index*)

son pocos, y concluyen que un BMI alto actúa como factor protector en la incidencia de TB y otras enfermedades infecciosas como la neumonía adquirida en la comunidad, la sepsis o el Chagas (72–74). Este hecho es conocido como la “paradoja de la obesidad”. En contraposición, existe la evidencia científica de que la obesidad es un factor que predispone al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), y además, es conocido que el tejido adiposo se encuentra estrechamente relacionado con el funcionamiento del sistema inmunológico y la inflamación (75,76). Por este motivo es importante aumentar los estudios que relacionen estas enfermedades con la incidencia, el desarrollo y la progresión de enfermedades infecciosas, y en específico de la TB.

La obesidad y las enfermedades metabólicas asociadas, entre las cuales está la DM2, se encuentran estrechamente relacionadas con la dieta. Además, la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de DM2, que se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre y resistencia a la insulina. Por otro lado, el síndrome metabólico se encuentra ligado a un metabolismo anómalo de la glucosa y los lípidos. Por tanto, existe una estrecha relación entre los 3 factores, siendo la obesidad un factor de riesgo para el desarrollo de DM2 y también un componente central del síndrome metabólico (77).

En la literatura constan algunos estudios en modelos animales de DM que evalúan la susceptibilidad a TB. Estos autores utilizan una cepa de ratón que presenta cierta resistencia a TB (C57BL/6), pero en la que se encuentra bien caracterizado el modelo de DM. Además, utilizan fármacos como la estreptozocina para la inducción de la DM mediante la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas, por lo que se asemeja a un modelo de diabetes mellitus tipo 1 (DM1). En estos estudios los animales con DM crónica presentan peor supervivencia y mayores BL, patología pulmonar y citoquinas proinflamatorias (78–80). Pero la situación actual en la que se encuentra la población, en la que hay una parcial resistencia a la insulina, síndrome metabólico y obesidad, no es evaluado en estos modelos. Por este motivo, es necesario el desarrollo de otros

modelos animales que mimeticen la situación real en la que se encuentran estos pacientes con presencia de comorbilidades, y en modelos animales con susceptibilidad a TB que reflejen el proceso que se da en humanos.

### 1.6.2. Microbiota intestinal

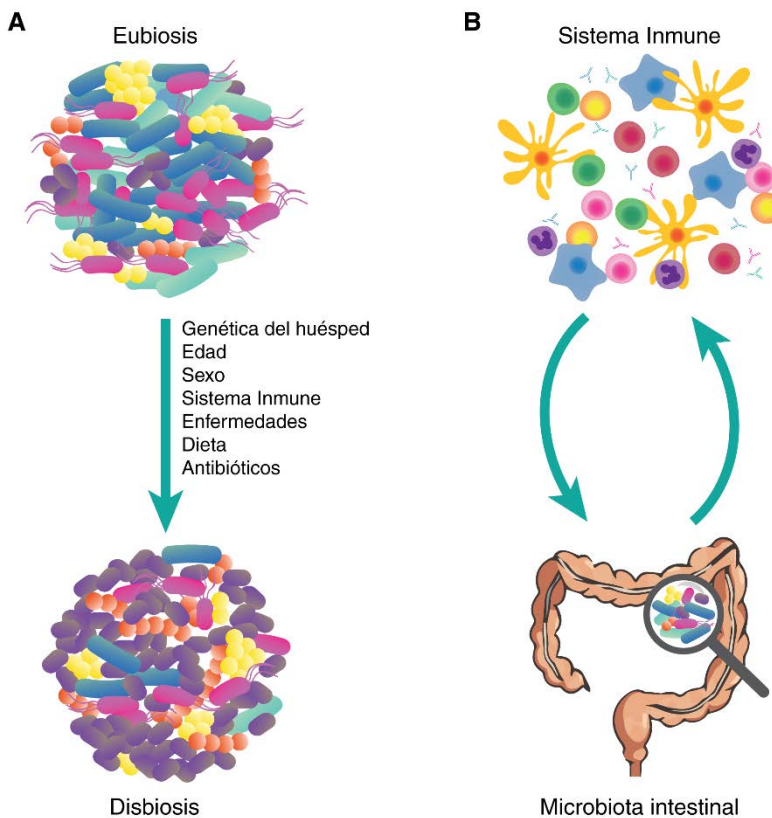
La microbiota consiste en una comunidad de múltiples especies microbianas que conviven en sinergia con el organismo huésped en determinados tejidos y fluidos. En humanos, está integrada por aproximadamente  $10^{14}$  microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, arqueas, protozoos y virus (81,82). Uno de los grandes nichos donde reside gran parte de la microbiota es el tracto gastrointestinal, donde encontramos la microbiota intestinal, la cual se encuentra íntimamente relacionada con la fisiología humana y la nutrición (83).

Pese a que todos los individuos no presentan una composición única, la microbiota intestinal está formada por miembros de principalmente 4 filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria. Aunque no se conocen todos, la diversidad de la microbiota intestinal puede verse influenciada por múltiples factores como pueden ser la genética del huésped, la edad, el sexo, el sistema inmune, las enfermedades, la dieta o los antibióticos (81,84). Cuando el balance entre las especies que componen la microbiota (eubiosis) se pierde, se produce una alteración de ésta (disbiosis) que puede favorecer el desarrollo de enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas (85) (**Figura 6A**).

Existe una interrelación entre el sistema inmune y la microbiota intestinal, donde el primero es capaz de modular la cantidad y la diversidad de la microbiota, y a su vez la microbiota intestinal es capaz de modificar los procesos inmunológicos del huésped. Además, la microbiota comensal es necesaria para el desarrollo del sistema inmune el cual tiene que aprender a diferenciar entre ésta y las bacterias con potencial patogénico (**Figura 6B**). Por consiguiente, los cambios en la microbiota pueden alterar las funciones del sistema inmunológico incrementando el riesgo de desarrollo

de enfermedades; y a su vez, diversas patologías pueden afectar a la composición de ésta (82,86).

La microbiota intestinal afecta a la respuesta del sistema inmunológico modulando una serie de vías relacionadas con la expansión de poblaciones de células T extraintestinales, la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, del inglés *short-chain fatty acid*), el desarrollo de la tolerancia oral y el control de la inflamación (87).



**Figura 6. Microbiota intestinal y sistema inmune.** (A) Los microorganismos que habitan en el intestino conviven en el organismo en un estado de equilibrio (eubiosis), que cuando se pierde (disbiosis) produce un cambio de las poblaciones de bacterias. (B) Las bacterias comensales del intestino son necesarias para el correcto funcionamiento del sistema inmune, y el sistema inmune modula la cantidad y el tipo de bacterias del intestino.

En este sentido, la microbiota intestinal es esencial para expansión de las células T CD4<sup>+</sup>, las células Treg, las respuestas Th1 o Th2, y las células Th17 (88–90). Además, cambios en el contenido de fibra de la dieta alteran la ratio Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) y, en consecuencia, a cómo la microbiota intestinal digiere la fibra. Esto hace que aumente o disminuya la concentración de SCFA, los cuales son importantes para la inmunidad de tipo sistémico. Entre los SCFA más importantes, encontramos el acetato, el propionato y el butirato, este último con actividad antiinflamatoria (81,91,92).

### 1.6.2.1 Microbiota y TB

La relación entre la microbiota intestinal y la TB ha sido analizada en diversos estudios debido al impacto que supone la administración de un tratamiento antibiótico de larga duración, como sucede en la TB, que provoca cambios persistentes de las poblaciones de bacterias residentes en el tracto digestivo (93–95).

Por otro lado, y aunque en menor cantidad, encontramos estudios como el de Navasivayam *et al.* en el que se estudia el estado de la microbiota intestinal basal como factor de predisposición a la TB. En su estudio concluyen que la presencia de una determinada microbiota actúa como factor de susceptibilidad hacia una enfermedad más severa, y los cambios de las poblaciones de bacterias que puede producir la infección *per se* resultan menos importantes (93). En cambio, Winglee *et al.* demuestran, en un modelo de ratón, que la infección con *Mtb* vía aerosol produce un cambio en la microbiota intestinal tan sólo 6 días después de la infección (96). Las ideas de ambos estudios no son excluyentes en sí mismas, pero se necesitan más estudios que puedan ayudar a dilucidar cuál es realmente el papel de la microbiota, tanto en la predisposición a una infección inicial como el papel que juega en el caso de reinfecciones, si ésta se ve substancialmente modificada.

### 1.6.2.2 Microbiota, dieta, obesidad y DM2

Existen evidencias de que la dieta modula la composición y función de la microbiota intestinal, y que la dieta es un factor clave para el desarrollo de la obesidad y las enfermedades asociadas a ella. Pero la dieta por sí sola, no es capaz de influir en el desarrollo de la obesidad, si no que la microbiota intestinal es indispensable y participa en el proceso (97). Por otro lado, la relación entre la microbiota y la DM2 se basa en la participación de la microbiota en el desarrollo de la obesidad, en su papel en la señalización de la insulina y en la inducción de un estado de inflamación de bajo grado (84).

Las bacterias beneficiosas más abundantes son las pertenecientes a los filos Bacteroidetes y Firmicutes. Con la obesidad y la DM2 existe una disminución de la proporción relativa de Bacteroidetes y un aumento de Firmicutes, con una ratio F/B aumentada (98–100). Este cambio de composición y diversidad de la microbiota en condiciones de obesidad contribuye a la producción de SCFA, que son conocidos por tener un papel modulando el sistema inmunológico (91).

Viendo la interconexión que existe entre todos los procesos: microbiota intestinal, obesidad, DM2, sistema inmunológico y TB; es importante ampliar el número de estudios destinados a conocer los mecanismos que conectan los distintos procesos para poder llegar a desarrollar un abordaje correcto de la TB en presencia de comorbilidades, en este caso obesidad y otras patologías asociadas.

## 1.7. Factores ambientales: infección única vs múltiple

El número de infecciones en TB es un aspecto a tener en cuenta. La infección por *Mtb* en la población es asimétrica lo que significa que se producen múltiples situaciones de infección (101). En determinadas poblaciones se produce una única infección, en cambio en regiones endémicas de TB se produce un proceso de reinfección continua. Por eso, además del modelo animal, también es importante tener en cuenta la ruta y



el números de infecciones con *Mtb* para imitar las condiciones de infección que se dan en humanos.

Una de las vías de administración de la bacteria es la intravenosa (i.v.), donde la inoculación de  $10^5$ - $10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU, del inglés *colony-forming units*) de *Mtb* produce una infección sistémica (102). Este tipo de infección produce una respuesta celular fuerte entre 1-2 semanas después, por lo que es un modelo rápido. En la cepa de ratón C3HeB/FeJ, los animales tienen un tiempo de supervivencia medio de aproximadamente 26 días (66).

En contraposición, los tipos de infección que utilizan la vía aérea resultan de mayor interés por ser la vía de infección natural de *Mtb*. Dentro de las vías aéreas de infección encontramos la vía intranasal, la vía intratraqueal y la vía aerosol. Las dos primeras vías de infección suelen mostrar una gran variabilidad en la cantidad de bacilos que se depositan en los alvéolos. Por consiguiente, la infección por vía aerosol sería la vía de elección para la infección con *Mtb* en modelos animales (102).

En general, los modelos de infección por aerosol con *Mtb* se han desarrollado utilizando una infección única de aerosol de dosis baja (LDA, del inglés *low-dose aerosol*) (63). Pero para intentar mimetizar lo que ocurre de manera natural en muchas regiones, es necesario utilizar el modelo de las infecciones múltiples consecutivas (MCI, del inglés *multiple consecutive infections*) (101).

En resumen, una correcta modelización de la TB en animales pasa por múltiples estadios: la elección del modelo animal, la ruta de infección y la cantidad de infecciones a realizar; todo ello para intentar simular experimentalmente las condiciones naturales de la manera más realista posible.

## 1.8. Factores relacionados con el patógeno: *cording*

Los factores relacionados con la virulencia de *Mtb* han sido estudiados extensamente. Los genes relacionados con factores de virulencia para *Mtb* y otras micobacterias

incluyen genes relacionados con muchos procesos: el metabolismo de lípidos y ácidos grasos, proteínas de la envoltura celular, proteínas que inhiben efectores antimicrobianos del macrófago, proteína quinasas, proteasas, proteínas transportadoras de metales, reguladores de expresión génica y otras proteínas relacionadas con virulencia (103).

Un factor que tiene cierta relevancia es la superficie celular de *Mtb*, ya que juega un papel importante en la patogénesis de la micobacteria. La superficie celular de la micobacteria tiene una estructura muy característica con presencia de ácidos micólicos, los cuales están relacionados con la formación del *cording* (104,105). El *cording* fue ya descrito por Koch en 1882, como la presentación de la bacteria formando agregados organizados en forma de cuerdas (1). Este factor fue estudiado más adelante por Middlebrook *et al.*, quienes comparaban la virulencia dos cepas, una virulenta y una avirulenta. Los cultivos de las bacterias de ambas cepas obtenidas a partir de ratones infectados mostraron distintas capacidades hacer *cording* (106).

En 1950, Bloch aisló un glicolípido, aparentemente exclusivo de la membrana *Mtb*, y lo llamó como *cord factor*. Más adelante, este lípido fue identificado como dimicolato de trehalosa (TDM) y fue descrito como el responsable de la formación del *cording* (107,108). Estudios posteriores, en cambio, demostraron que este glicolípido no era exclusivo de la membrana de *Mtb* y que se encontraba presente en la membrana de prácticamente todas las especies de *Mycobacterium* (109).

El estudio de genes relacionados con la síntesis de los ácidos micólicos, han demostrado la alteración morfológica de la colonia, la pérdida del *cording*, y la consiguiente pérdida de virulencia de la bacteria. Por consiguiente, la formación del *cording* no depende exclusivamente de TDM sino que participan múltiples factores de la envoltura de la bacteria (109–111).

Como se ha citado anteriormente, el *cording* se ha estudiado analizando la diferente capacidad de dos cepas en la formación de *cording*, pero Caceres *et al.* describieron la capacidad de una misma cepa de formar *cording* según la fase de crecimiento en la

que se encuentre la bacteria (112). En relación a esto, un estudio llevado a cabo con *Mycobacterium abscessus* muestra que la morfología de las colonias afecta a la virulencia y la capacidad de formación de *cording* (113).

La formación de *cording* puede afectar a la virulencia de la bacteria, por tanto, es un factor que se tiene que tener en cuenta en el momento de la realización de modelos animales de infección con *Mtb* a partir de stocks congelados y la reproducibilidad de los experimentos.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



La TB se encuentra entre las 10 principales causas de muerte en el mundo. La única vacuna disponible contra la TB es la BCG, aunque ésta presenta una eficacia variable. Existen diversos factores que afectan al desarrollo y la evolución de la enfermedad. Estos factores están relacionados con el huésped (comorbilidades), con el ambiente (reinfecciones) y con el patógeno (*cording*).

Nuestra hipótesis es que si se incorporan los distintos factores que influyen en el desarrollo y la progresión de la TB en un modelo animal, se obtiene un modelo más real, en el que se mimetizan las características de la enfermedad en humanos y valioso para testar nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas. Teniendo en cuenta factores, se plantean los siguientes objetivos.

- 1- Desarrollar un modelo animal de comorbilidad para el estudio de la obesidad como estadio previo a la DM2.
- 2- Evaluar la idoneidad del modelo de comorbilidad para evaluar nuevos candidatos a vacuna utilizando la BCG como vacuna de referencia.
- 3- Evaluar el *cording* de la bacteria como factor de virulencia que afecta al desarrollo de la enfermedad.





### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



### 3.1. Ética y animales

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a los procedimientos DMAH6119, DMAH9091 y DMAH9071, los cuales fueron revisados por el comité ético de experimentación animal del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (registrado como B9900005) y aprobados por el Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya de acuerdo a la legislación nacional actual y de la Unión Europea actual en relación a la protección de animales de experimentación.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en un laboratorio de seguridad biológica de nivel 3. Los animales fueron estabulados manteniendo un ciclo de iluminación de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y en una sala con temperatura y humedad reguladas.

Los animales fueron supervisados diariamente siguiendo un protocolo estricto de monitorización con el fin de asegurar el bienestar animal. Otra de las medidas utilizadas para asegurar el bienestar animal fue el registro semanal de los pesos de los animales. Estos datos fueron utilizados para analizar la evolución y el impacto de las diferentes condiciones experimentales en el estudio I. En caso necesario, los animales que no superaron los criterios de bienestar establecidos fueron sacrificados mediante la inhalación de isoflurano.

El estudio I se realizó utilizando hembras libres de patógenos específicos de la cepa de ratón C3HeB/FeJ, con una edad de entre 6 y 8 semanas y obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA). El estudio II se realizó utilizando hembras y machos libres de patógenos específicos de la cepa de ratón C3HeB/FeJ; con una edad de entre 5-8 semanas para los experimentos 1 y 2, y 14-15 semanas para el experimento 3; y obtenidos a partir del Centre de Medicina Comparativa i Bioimatge de Catalunya (CMCiB).

Los animales del estudio I que tenían la obesidad como factor de estudio recibieron una dieta con un alto contenido en grasas, específicamente un 60,3% de calorías provenientes de grasas (TD.06414 Adjusted Calories Diet (60/Fat), Envigo). El resto de los animales fueron alimentados con una dieta comercial convencional que contenía un 13% de calorías provenientes de grasas (2014S Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Envigo).

## 3.2. Diseño experimental

### 3.2.1. Estudio I

El estudio I se ha llevado a cabo dentro del programa H2020 en el proyecto TBVAC2020: Advancing novel and promising TB vaccine candidates from discovery to preclinical and early clinical development (Grant agreement ID: 643381).

#### 3.2.1.1 Experimento 1

El objetivo del experimento 1 fue analizar la comorbilidad entre TB y obesidad inducida con una dieta alta en grasas (HFD, del inglés *high fat diet*) en un modelo de ratón de TB activa, así como el efecto de la vacunación con BCG y dos tipos de infección por aerosol: la infección única (SI, del inglés *single infection*) y la infección múltiple consecutiva (MCI, del inglés *multiple consecutive infection*).

La combinación de todas las variables de estudio da lugar a 8 grupos experimentales, los cuales se detallan en la **Tabla 2**.

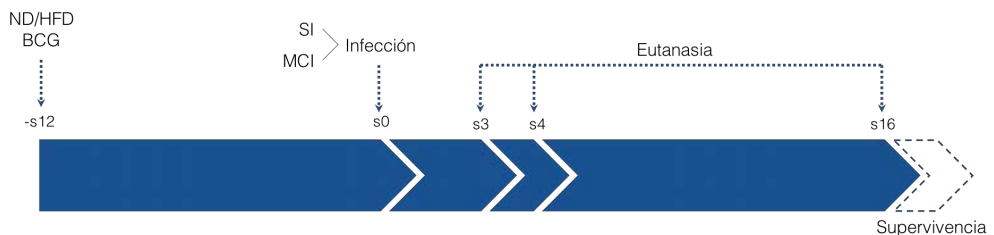
El número total de animales utilizados para el experimento fue de 240, repartidos en los 8 grupos experimentales anteriormente especificados. El inicio del experimento se estableció 12 semanas antes de la infección, cuando los animales empezaron los dos tipos de dietas: HFD o ND. En este mismo punto se vacunaron los grupos correspondientes con  $10^6$  CFU de BCG Live U.S.P (SII-ONCO-BCG®) o suero fisiológico (sham).

**Tabla 2.** Grupos experimentales y variables de estudio en el experimento 1 del estudio 1.

Grupo	Variables de estudio		
	Obesidad	BCG	Tipo de infección
ND-SI	No	No	SI
ND-MCI	No	No	MCI
ND-BCG-SI	No	Sí	SI
ND-BCG-MCI	No	Sí	MCI
HFD-SI	Sí	No	SI
HFD-MCI	Sí	No	MCI
HFD-BCG-SI	Sí	Sí	SI
HFD-BCG-MCI	Sí	Sí	MCI

Una vez transcurridas las 12 semanas, todos los animales fueron infectados vía aerosol con *Mtb*, cepa Pasteur H37Rv. Con esta infección se depositaron alrededor de 50 CFU en pulmón, utilizando un aparato que genera aerosoles infecciosos (Glascol Inc., Terre Haute, IN, USA). Los dos tipos de infección que se realizaron fueron la SI, donde se realizó una única infección, y la MCI, donde se realizaron 8 infecciones en 5 días, mañana y tarde dejando un día de descanso entre medio.

El diseño del experimento 1 se esquematiza en la **Figura 7**. Se eutanasiaron los animales a semana 3 posinfección (p.i.) (n=5 por grupo experimental, excepto para el grupo ND-MCI con n=4), a semana 4 p.i. (n=5 por grupo experimental) y a semana 16 p.i. (n=10 por grupo experimental). En cada uno de los puntos de eutanasia, se analizó la BL y la patología pulmonar. En la eutanasia de semana 4 p.i. se recogieron muestras pulmonares para evaluar la respuesta inmunológica.

**Figura 7.** Diseño del experimento 1-Estudio I.

En las eutanasias de las semanas 4 y 16 p.i. se recogieron muestras fecales para el análisis de la microbiota intestinal. Finalmente, se dejaron 10 animales por grupo para analizar la supervivencia.

### 3.2.1.2 Experimento 2

Se planteó un segundo experimento en el que se marcó como objetivo evaluar las diferencias de protección que conferirían la vacunación por BCG (experimento 1) y la inmunidad natural (NI, del inglés *natural immunity*) (experimento 2).

Se entiende la NI como la protección que se da en un individuo que se infecta con *Mtb* y es capaz de controlar dicha infección. Para lograrlo de forma experimental, se infectan los animales con SI y se administra un tratamiento antibiótico para disminuir la BL. Las variables de estudio y los grupos experimentales que se generan con la combinación de todas ellas se encuentran descritos en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Grupos experimentales y variables de estudio en el experimento 2 del estudio 1.

Grupo	Variables de estudio		
	Obesidad	Protección	Tipo de infección
ND-NI	No	NI	MCI
HFD-NI	Sí	NI	MCI

Los resultados de este experimento se presentan comparando con los grupos ND-MCI y HFD-MCI del experimento 1, ya corresponden a grupos control para los del experimento 2. El diseño del experimento se esquematiza en la **Figura 8**. Para este experimento se utilizaron 30 animales. Se infectaron con SI de *Mtb* con la cepa Pasteur H37Rv. En este mismo punto del experimento, los ratones empezaron los dos tipos de dieta, ND y HFD. Dos semanas después de la infección, los animales comenzaron un tratamiento antibiótico de 10 semanas, basado en isoniazida y rifapentina (25 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente). Una vez finalizado el tratamiento antibiótico, los animales se infectaron con MCI. Cuatro semanas después de la MCI se eutanasiaron 5 animales por grupo y se recogieron muestras fecales para

el análisis de la microbiota intestinal. Se dejaron 10 animales por grupo para evaluar la supervivencia de los mismos.

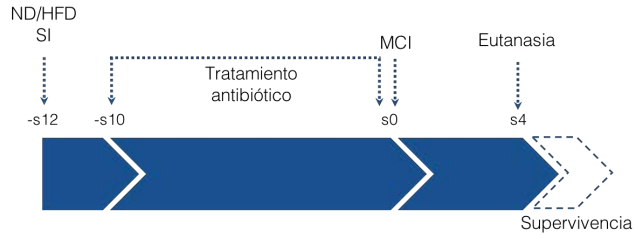


Figura 8. Diseño del experimento 2-Estudio I.

### 3.2.2. Estudio II

Para llevar a cabo el objetivo 3, se realizaron tres experimentos para evaluar qué diferencias se hallaban al infectar animales con la misma cepa de *Mtb* pero con dos lotes con distinta capacidad de hacer *cording*.

#### 3.2.2.1 Experimento 1

El primer experimento representó la prueba de concepto. Se infectaron vía i.v. animales con los dos lotes de la cepa *Mtb* H37Rv. Se utilizaron 24 animales repartidos en dos grupos experimentales. Para ver el efecto de los dos lotes se eutanasiaron los animales a diferentes días p.i.: día 17 (n=3), día 21 (n=3), día 24 (n=3) y día 28 (n=3). En cada uno de los puntos de eutanasia se analizaron tanto la BL como la patología pulmonar (Figura 9).

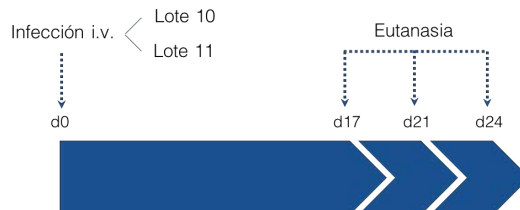
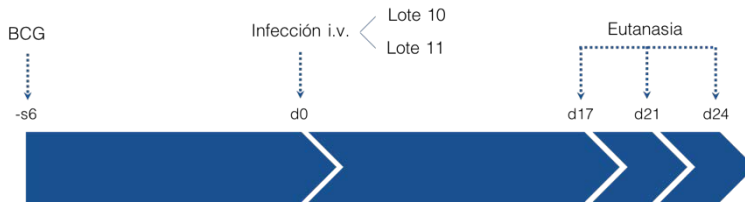


Figura 9. Diseño del experimento 1-Estudio II.

### 3.2.2.2 Experimento 2

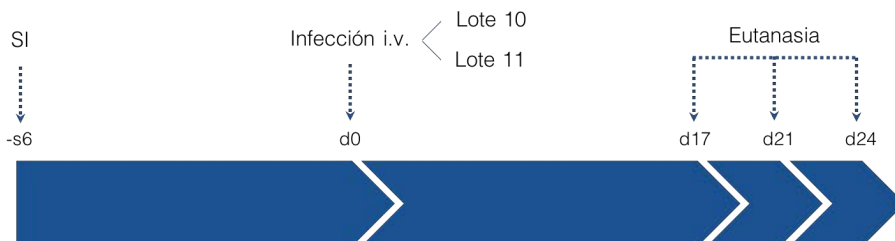
En el segundo experimento, se evaluó la protección de la BCG en animales infectados con dos lotes de la cepa *Mtb* H37Rv. Se utilizaron 56 animales repartidos en cuatro grupos experimentales. La vacunación, con BCG o sham, se realizó 6 semanas antes de la infección. Los animales fueron infectados vía i.v. con *Mtb*: dos grupos con el lote 10 y los otros dos con el lote 11. Se eutanasiaron los animales a diferentes días p.i.: día 17 (n=4), día 21 (n=5) y día 24 (n=5). Se extrajeron muestras en cada punto de eutanasia para analizar la BL y la patología, ambos en tejido pulmonar. También se utilizaron muestras pulmonares para analizar la respuesta inmunitaria (**Figura 10**).



**Figura 10. Diseño del experimento 2-Estudio II**

### 3.2.2.3 Experimento 3

En el último experimento, y viendo los resultados del experimento anterior, se quiso analizar si era comparable la protección que ofreció la vacunación con BCG a la que puede ofrecer una SI de aerosol. El diseño experimental se esquematiza en la **Figura 11**.



**Figura 11. Diseño del experimento 3-Estudio II.**



Para este experimento se utilizaron 60 animales repartidos en 4 grupos experimentales. Los grupos en los que se evaluaba la SI fueron infectados por aerosol. A las 6 semanas, todos los animales fueron infectados vía i.v. con *Mtb*: dos grupos con el lote 10 y los otros dos con el lote 11. Se eutanasiaron los animales a diferentes días p.i.: día 17 (n=4), día 21 (n=5) y día 24 (n=5). Se extrajeron muestras en cada punto de eutanasia para analizar la BL y la patología, ambos en tejido pulmonar. También se utilizaron muestras pulmonares para analizar la respuesta inmunitaria.

### 3.3. Parámetros bioquímicos

En el estudio I se realizó una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT, del inglés *glucose tolerance test*) y se midieron los niveles de colesterol y de HDL.

La OGTT se realizó 11 semanas después de del inicio de la alimentación con los dos tipos de dieta (n=6). Previamente a la prueba, se dejaron a los animales en ayuno toda la noche. Al día siguiente, se administraron 2g/kg de glucosa con sonda. Se tomaron muestras de sangre a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos y se midieron los niveles de glucosa con un glucómetro (Accutrend Plus, Roche Diagnostics, Switzerland).

Para medir los niveles de colesterol y HDL se tomaron muestras de sangre de los ratones y se analizaron mediante turbidimetría.

### 3.4. BL

La BL se evaluó en homogenados de tejido pulmonar del lóbulo izquierdo, disgregado mecánicamente utilizando un homogeneizador de vidrio. De la suspensión de bacterias obtenida, se realizaron diferentes diluciones seriadas y se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H11 (BD Diagnostics, Sparks, USA). Se incubaron durante 28 días a 37°C y se contaron las CFU visibles. Los resultados se graficaron y expresaron como Log CFU/ml.

### 3.5. Patología pulmonar

La patología pulmonar se evaluó en el lóbulo inferior derecho. Las muestras pulmonares fueron fijadas en formol al 10% en solución tamponada e incluidas en parafina. Los bloques parafinados se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor y cada sección se tiñeron utilizando la tinción hematoxilina-eosina.

Las muestras fueron analizadas utilizando el *software* NISElements D versión 3.0x (Instruments Inc., Tokyo, Japan). Para el análisis se evaluaron cuatro cortes de cada muestra pulmonar para determinar el área lesionada como un porcentaje respecto del área total pulmonar.

### 3.6. Supervivencia

Las diferentes condiciones experimentales se evaluaron analizando la supervivencia de los animales. El criterio de punto final en los experimentos de evaluación de la supervivencia es el mismo que describe en el apartado 3.1. Se realizan curvas de supervivencia para determinar las diferencias existentes entre los diferentes grupos experimentales.

### 3.7. Análisis de la respuesta inmunológica

El análisis del perfil de citoquinas se realizó en homogenados de tejido pulmonar de los lóbulos superior derecho y medio. Las citoquinas que se analizaron con la tecnología Luminex xMAP® fueron: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL12, IL-17, LIX (CXCL5) y KC (CXCL1).

El ensayo se realizó con el kit MILLIPLEX® MAP (EMD Millipore Corporation, Billerica, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y fue analizado con el *Software* xPONENT (Luminex Corporation, Austin, USA). Los resultados se expresaron como pg por ml de homogenado.

### 3.8. Análisis de la microbiota intestinal

Los experimentos relacionados con el análisis de la microbiota intestinal se llevaron a cabo en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), en colaboración con la Unidad de Genómica de la Tuberculosis liderada por el Dr. Iñaki Comas, y gracias a la ayuda de perfeccionamiento y movilidad concedida por el Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES).

#### 3.8.1. Procesamiento de la muestra y extracción de ADN

Se extrajo el ciego de los animales en el momento del sacrificio con el fin de obtener muestra fecal y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para extraer el ADN de las muestras, se descongelaron en hielo y se separaron las heces del tejido epitelial. Una vez obtenidas las muestras fecales, el ADN fue extraído utilizando el kit comercial QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany), de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se modificó el primer paso del protocolo añadiendo bolas de vidrio de 4 mm para favorecer la lisis celular. Se midió la concentración de eluido final fluorimétricamente mediante el kit comercial Qubit dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, USA) y se almacenaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la preparación de la librería génica para el análisis del gen 16S rRNA.

#### 3.8.2. Secuenciación del gen 16S rRNA

El ADN microbiano se analizó con la guía *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation guide* proporcionada por la casa Illumina® con algunas modificaciones. El protocolo tiene como diana la amplificación de las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA, utilizando el kit KAPA HiFi HotStart PCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, USA). La composición de la PCR fue la siguiente: 1X KAPA HiFi Fidelity Buffer, 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,3 mM KAPA dNTP Mix, 0,3  $\mu\text{M}$  primers, 0,5 U KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase y 15 ng DNA template. El programa de PCR con Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg, Germany) contenía los siguientes pasos:

desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos; 18 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos; y una extensión final a 72°C durante 4 minutos. Se espera un producto final de una extensión aproximada de 550 pares de bases. Los productos de PCR fueron purificados con microesferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, USA) utilizando el soporte magnético 96 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Se realizó un control de calidad de los productos de PCR con un gel de agarosa al 1,4%. La PCR de indexado se realizó utilizando el kit de preparación de librerías de ADN Nextera XT (Illumina, San Diego, USA) y el kit de PCR KAPA HiFi HotStart de la siguiente manera: 1X *KAPA HiFi Fidelity Buffer*, 0,5 mM *MgCl<sub>2</sub>*, 0,3 mM *KAPA dNTP Mix*, 0,3 μM *primers*, 0,5 U *KAPA HiFi HotStart DNA polymerase* y 5 μl de *Nextera XT Index 1 Primers* y *Nextera XT Index 2 Primers* por muestra. Se realizó el procedimiento de acuerdo a la guía *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*. Las librerías obtenidas se purificaron de la misma forma que los productos de PCR. Las concentraciones de ADN finales de los productos de PCR se midieron con fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) y fueron validados mediante electroforesis automatizada con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Los productos purificados fueron diluidos hasta obtener una concentración final de 4 nM y, a continuación, fueron agrupados. Los productos agrupados fueron desnaturalizados y la muestra fue cargada de acuerdo a la guía *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* en una concentración final de 7 pM. Las librerías del gen 16S rRNA fueron secuenciadas con lecturas 2 x 300 *paired-end* con la plataforma MiSeq system (Illumina, San Diego, USA).

### 3.9. Análisis de los agregados de bacteria

En los experimentos del estudio II se comparó la agregación de las bacterias para hacer *cording*. Se fijaron en un portaobjetos 8 gotas de 20 μl del cultivo de los dos lotes de la cepa Pasteur H37Rv y se tiñeron mediante la tinción Ziehl-Neelsen. Se tomaron 3 fotografías por gota con el microscopio Eclipse 50i (Nikon, Tokyo, Japan)

equipado con la cámara DS-Fi 1 (Nikon, Tokyo, Japan) y el *software* NISElements D versión 3.0x (Instruments Inc., Tokyo, Japan). Las bacterias y/o agregados fueron detectados mediante análisis de imagen con el *software* MATLAB (MATLAB, vs 9.3; The MathWorks®). La imagen en color original fue transformada en una imagen en blanco y negro. Las regiones aisladas negras fueron definidas como puntos, representando cualquier partícula detectada (desde una única bacteria hasta grandes agregados o cuerdas). Se determinó el número de puntos, el área de cada uno de ellos y el área total que representan todos los puntos para cada uno de los lotes.

### 3.10. Microscopía electrónica

Para visualizar el *cording* mediante microscopía electrónica, se extrajeron los pulmones cortando por la tráquea y se perfundieron con solución fijadora, 2,5% (v/v) de glutaraldehído y 2% (p/v) de paraformaldehído (EM grade, Merck, Darmstadt, Germany), utilizando una jeringa unida a un catéter hasta que se llenó todo el árbol bronquial. Finalmente, los pulmones fueron mantenidos en solución fijadora. Los pulmones fueron mantenidos en solución fijadora durante 12 horas, y en caso de precipitación sanguínea, el agente fijador fue reemplazado.

A continuación, los pulmones fueron fijados durante 2 horas con tetróxido de osmio al 1% (p/v) (TAAB Lab., UK) seguido de lavados con agua desionizada y de una deshidratación secuencial mediante series ascendentes de etanol (50, 70, 80, 90 y 95% durante 10 min cada uno y dos veces con etanol 100%).

Para el análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*), los órganos fijados fueron cortados con unas cuchillas a diferentes alturas y direcciones y luego fueron colocados en discos adhesivos de carbono. Las muestras fueron metalizadas (Emitech K550X Sputter Coater Metallizer) utilizando una aleación de oro-paladio en ciclos de 3-4 minutos cambiando la orientación del soporte. Finalmente, las muestras fueron analizadas

utilizando el microscopio de barrido Zeiss EVO® MA 10 (Oberkochen, Germany) a 15kV.

### 3.11. Estadística y análisis bioinformático de las secuencias

Las comparaciones entre grupos para el Estudio I (peso, BL, patología pulmonar, índices de diversidad, composiciones taxonómicas y ratio F/B) y el Estudio II (BL, patología pulmonar y respuesta inmunológica) se realizaron mediante el test estadístico no paramétrico Mann-Whitney utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad software v6.0, La Jolla, California, USA).

El análisis de la evolución del peso se realizó mediante el test de regresión lineal. Las curvas de supervivencia se crearon utilizando el estimador de Kaplan-Meier y fueron comparadas utilizando el test de Log rank, utilizando también el programa estadístico GraphPad Prism.

Las diferencias estadísticamente significativas se indican de la siguiente manera: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 3.11.1. Análisis de la respuesta inmunológica

El test ANOVA de tres vías se utilizó para evaluar el efecto de la dieta, de la infección y de la vacunación con BCG. Se aplicó una transformación logarítmica con el fin de normalizar las concentraciones de las citoquinas analizadas. Para obtener el mismo número tamaño muestral en todos los grupos, el valor ausente en el grupo ND-MCI fue sustituido por el valor correspondiente a la media del grupo. Las múltiples comparaciones entre las medias de los grupos que difieren en un solo factor se realizaron utilizando el test Holm-Sidak. Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad software v7.0, La Jolla, California, USA).

La respuesta inmunológica en el Estudio I y el Estudio II también se analizó utilizando el análisis de componentes principales (PCA, del inglés *principal component analysis*)

utilizando RStudio (versión 1.1.463). Las concentraciones de las citoquinas fueron escaladas a unidades de varianza. Para analizar las diferencias de PC1 de los grupos experimentales del Estudio II, se utilizó el test ANOVA de una vía.

### 3.11.2. Análisis de la diversidad bacteriana

Los archivos con las lecturas obtenidas fruto del proceso de secuenciación se analizaron utilizando el *mothur pipeline* (versión 1.39.5). Las lecturas *paired-end* fueron unidas y pasaron un proceso de control de calidad. Las secuencias se alinearon utilizando la base de datos de referencia SILVA. Los alineamientos que no encajaron exactamente con nuestra región de interés fueron eliminados. Las secuencias fueron agrupadas y las secuencias quiméricas fueron identificadas y eliminadas. A continuación, las secuencias fueron clasificadas taxonómicamente utilizando la base de datos *Ribosomal Database Project* y se eliminaron aquellas clasificadas como cloroplastos, mitocondrias, *archaea* y eucariotas. Las distancias entre secuencias fueron calculadas con un punto de corte establecido en 0,03. Después de crear una matriz de distancias, las secuencias con >97% de similitud fueron agrupadas en unidades taxonómicas operativas (OTUs). Los OTUs fueron filtrados y sólo aquellos con una abundancia relativa mayor a 0,1% y presentes en al menos 2 muestras fueron conservadas. Cada OTU fue clasificado taxonómicamente en el último taxón posible, siendo género en el máximo rango capaces de clasificar con el método de secuenciación utilizado. Se realizaron las curvas de rarefacción y se calcularon los índices de diversidad y riqueza y las distancias entre las muestras utilizando RStudio (versión 1.0.143). La diversidad fue cuantificada utilizando el test de disimilitud de Bray-Curtis y graficada utilizando el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, del inglés *non-metric multidimensional scaling*). Para analizar las diferencias de diversidad entre muestras se utilizó la medida de la diversidad beta que comprende, entre otros, los índices de Shannon, Simpson e Inverso de Simpson.





## 4. RESULTADOS (ESTUDIO I)



Los resultados del estudio I se encuentran en proceso de revisión en la revista *Frontiers in Immunology* (Anexo 1).

El estudio I está compuesto por dos experimentos. En el primer experimento se han evaluado tres condiciones experimentales en un modelo de TB activa. Los resultados de este primer experimento se presentarán analizando la influencia de los siguientes factores:

- 1- La vacunación con BCG
- 2- La dieta
- 3- La dosis de infección

Para el análisis de los resultados de cada una de las condiciones se procedió a la reordenación de los resultados globales, para así poder analizar las comparaciones pertinentes. Por ello, los resultados en formato de gráfica serán presentados en la primera condición experimental, y para las restantes se representarán los resultados en formato de tabla resumen, incluyendo el valor estadístico de la comparación.

En el segundo experimento se evalúa la capacidad de protección de la NI en comparación a la que proporciona la vacunación con BCG (resultados del experimento 1).

#### **4.1. Inducción de la obesidad**

En el estudio I se ha creado un modelo comorbilidad de TB-obesidad inducida mediante HFD. La alimentación con HFD ha sido utilizada para inducir un estado de DM2 temprana. Para comprobarlo en nuestro estudio se ha realizó una OGTT y se midieron los niveles de colesterol y HDL a diferentes semanas. Los resultados muestran una intolerancia a la glucosa y unos niveles de colesterol y HDL más elevados en los animales alimentados con dieta alta en grasas (**Figura 12**).

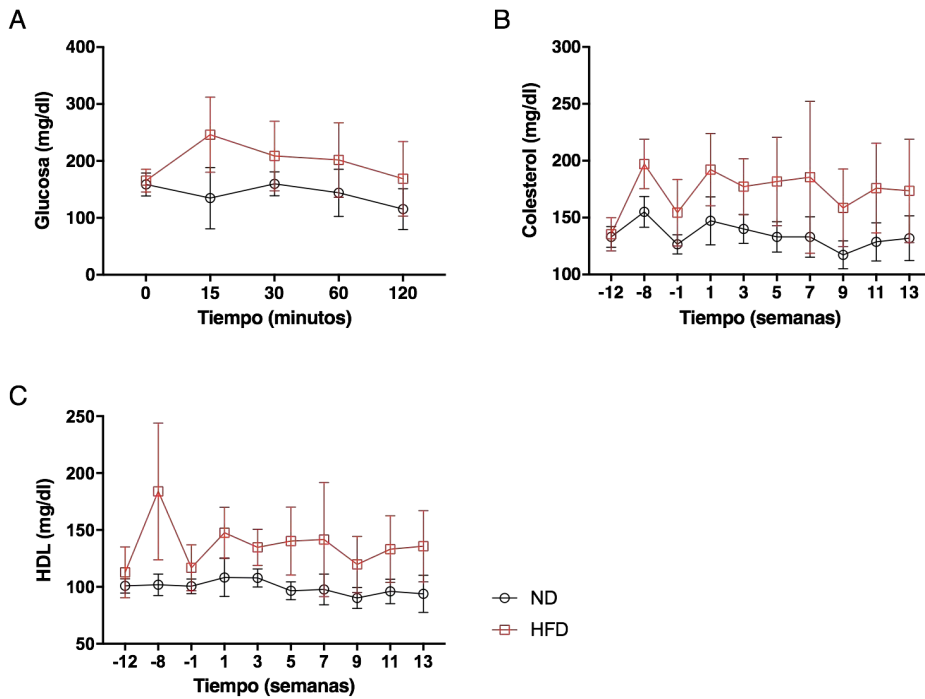


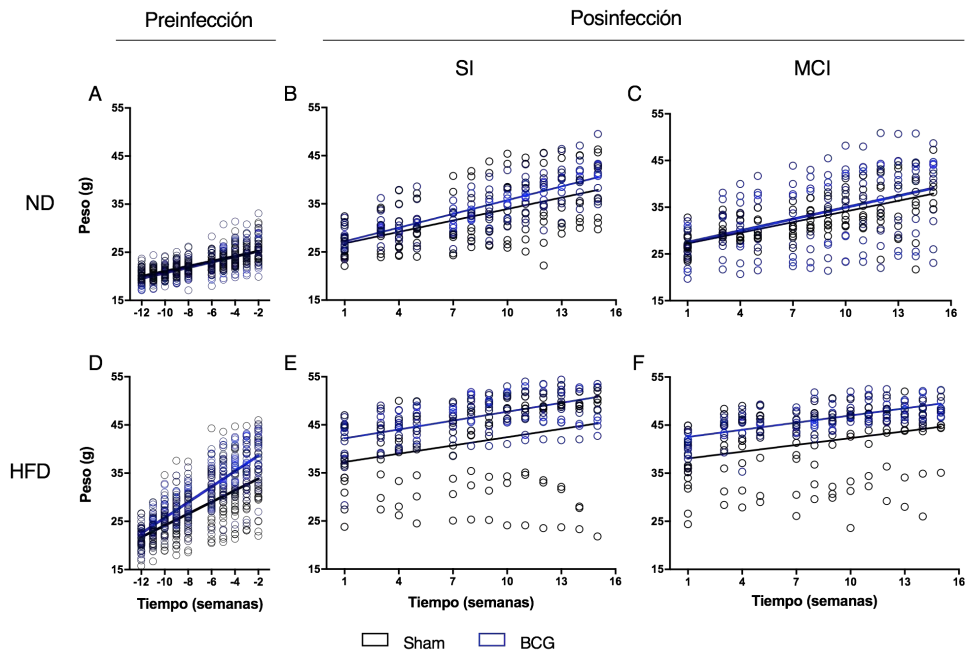
Figura 12. Análisis de los parámetros bioquímicos en el modelo de obesidad. (A) Niveles de glucosa en la prueba de tolerancia oral a la glucosa. Niveles de colesterol (B) y HDL (C) a diferentes semanas. Test ANOVA: (A)  $p=0,0250$ , (B)  $p<0,0001$ , (C)  $p<0,0001$ .

## 4.2. Evaluación del efecto de la vacunación con BCG

El efecto de la vacunación con BCG se ha analizado mediante el peso; la BL y la patología pulmonar, ambas a semana 3, 4 y 16 p.i.; y la supervivencia.

### 4.2.1. Peso

El peso de los animales se ha utilizado como parámetro para asegurar el bienestar animal, pero también para evaluar la evolución de los mismos según sus variables de estudio. La evolución del peso se encuentra representada en la **Figura 13** y las pendientes de los diferentes grupos y la estadística de las comparaciones se encuentran recogidas en la **Tabla 4**.



**Figura 13. Evolución del peso de los animales según el estado de vacunación.** En cada panel se compara el peso de los animales sham con el de los vacunados con BCG. Los paneles superiores describen los pesos de los animales alimentados con ND divididos por el estado infección: preinfección (A) y posinfección. En posinfección se muestra dividido por el tipo de infección, SI (B) y MCI (C). Los paneles inferiores describen los pesos de los animales alimentados con HFD divididos por el estado de infección: preinfección (D) y posinfección. En posinfección, se muestra dividido según el tipo de infección, SI (E) y MCI (F). Test de regresión lineal

**Tabla 4.** Valores de la pendientes obtenidas mediante el análisis de regresión lineal de los diferentes grupos experimentales, comparando por estado de vacunación y el *p*-valor resultado de la comparación.

Grupos experimentales		Pendiente	<i>p</i> -valor
Preinfección	ND	0,521	0,350
	ND-BCG	0,565	
	HFD	1,213	0,0002
	HFD-BCG	1,61	
Posinfección	ND-SI	0,793	0,270
	ND-BCG-SI	0,952	
	ND-MCI	0,762	0,6936
	ND-BCG-MCI	0,828	
	HFD-SI	0,574	0,8177
	HFD-BCG-SI	0,616	
	HFD-MCI	0,472	0,8650
	HFD-BCG-MCI	0,496	

El análisis del peso en preinfección mostró que los animales alimentados con ND presentaban un peso similar (**Figura 13A**) en ambos estados de vacunación. En los animales alimentados con HFD se observó un mayor incremento en los vacunados con BCG (**Figura 13D**).

El análisis del peso posinfección (**Figura 13B, C, E, F**) mostró que no habían diferencias significativas en el aumento de peso de los animales. Pese a todo, las diferencias observadas en preinfección se mantuvieron en postinfección.

La BCG favorece ligeramente el incremento del peso en los animales que siguieron HFD y no tanto en los ND.

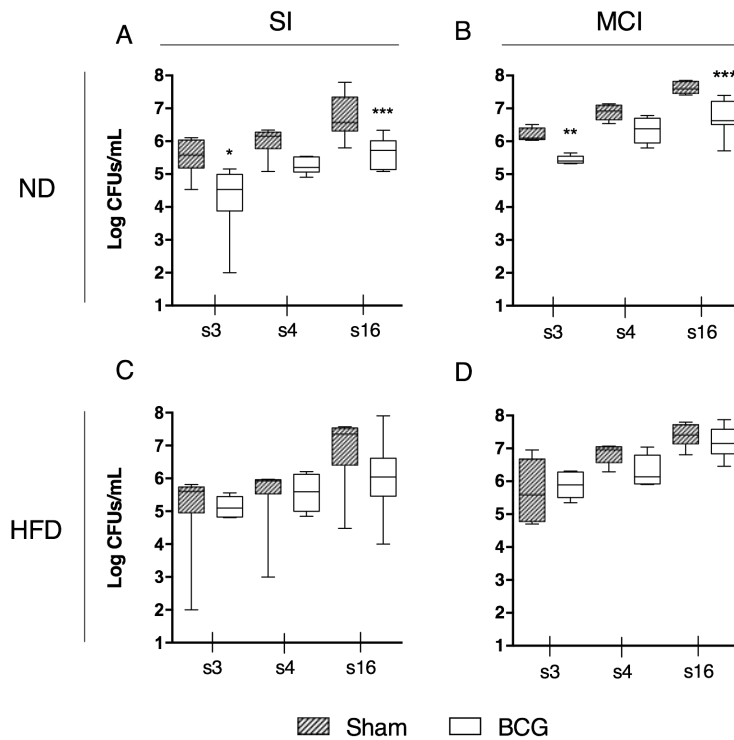
#### 4.2.2. BL

La BL aumenta a lo largo del estudio independientemente de la vacunación. El análisis en los animales alimentados con ND mostró que la BCG redujo la BL. Este comportamiento se observó independientemente del tipo de infección a la que fueron expuestos: SI (**Figura 14A**) o MCI (**Figura 14B**). Estas diferencias fueron observadas en las diferentes semanas de estudio. En cambio, los animales que siguieron HFD y a su vez fueron vacunados con BCG no experimentaron una reducción de la BL con respecto a los sham. Este efecto se observó en los animales expuestos a ambos tipos de infección: SI (**Figura 14C**) y MCI (**Figura 14D**).

La BCG no es capaz de disminuir la BL en animales alimentados con HFD mientras que sí presenta eficacia en animales alimentados con ND.

#### 4.2.3. Patología pulmonar

El análisis de las diferencias a nivel de patología pulmonar de los animales sham en comparación a los vacunados con BCG mostró dos comportamientos distintos dependiendo del tipo de dieta.

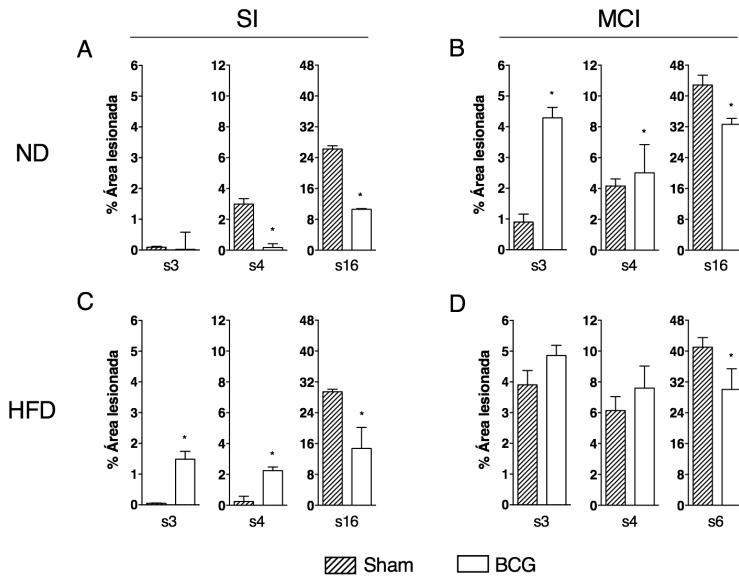


**Figura 14. Evolución de la BL a lo largo del experimento (semanas 3, 4 y 16 p.i.).** Cada panel compara la BL de los animales sham con la de los vacunados con BCG, en las diferentes condiciones experimentales: ND y SI (A), ND y MCI (B), HFD y SI (C), HFD y MCI (D). Las cajas representan el mínimo, el primer cuartil, la mediana, el tercer cuartil y el máximo. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; test Mann-Whitney.

Los alimentados con ND y vacunados presentaron una reducción de la patología pulmonar al ser expuestos a SI (**Figura 15A**). Sin embargo, si estaban expuestos a MCI, la patología pulmonar de los vacunados resultó ser mayor a tiempos iniciales (semana 3 y 4 p.i.) e inferior a semana 16 p.i. (**Figura 15B**).

El análisis de los ratones alimentados con HFD mostró un comportamiento distinto. Los animales expuestos tanto a SI como a MCI mostraron un comportamiento similar al de los animales alimentados con ND y expuestos a MCI, donde la patología fue mayor en los vacunados a semanas tempranas, pero al final del experimento la BCG mostró una reducción de la patología en comparación a los sham (**Figura 15C, D**).

En ND, los animales vacunados y expuestos MCI realizan un rápido reconocimiento de la bacteria, debido a la activación del sistema inmunológico. Esta activación sería más tardía en los expuestos a SI. En cambio, en HFD, este reconocimiento se produce en animales bajo ambos tipo de infección.

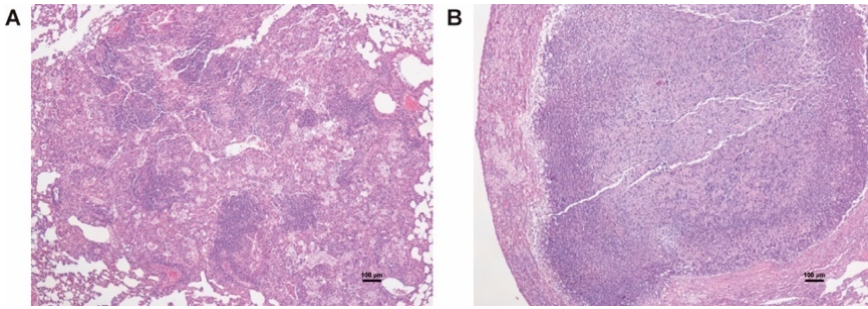


**Figura 15. Progresión de la patología pulmonar a lo largo del experimento (semanas 3, 4 y 16 p.i.).** Cada panel compara el porcentaje de área lesionada de los animales sham y los vacunados BCG en las diferentes condiciones experimentales: ND y SI (A), ND y MCI (B), HFD y SI (C), HFD y MCI (D). Las barras representan la mediana y el rango.  $*p \leq 0.05$ , test Mann-Whitney.

La patología pulmonar de los ratones infectados con *Mtb* se puede analizar de dos maneras distintas. No sólo es importante la cantidad de tejido pulmonar lesionado, por tanto, la cantidad de lesiones que encontramos en los pulmones de los animales bajo diferentes condiciones experimentales, sino también la naturaleza de estas lesiones. La naturaleza o tipo de lesiones que podemos encontrar son las lesiones exudativas y las lesiones proliferativas (**Figura 16**).

El análisis de la calidad de las lesiones se realizó contando el porcentaje de lesiones exudativas respecto al área total lesionada.

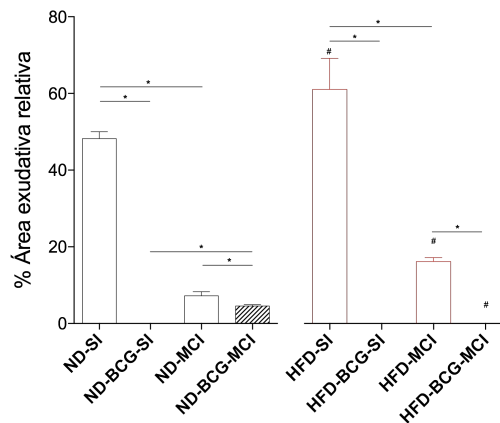




**Figura 16. Tipo de lesiones pulmonares en ratones C3HeB/FeJ infectados con *Mtb*.** Secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina. (A) Lesión proliferativa. (B) Lesión exudativa. Barra de escala: 100 µm.

La **Figura 17** muestra que en los animales vacunados las lesiones son de tipo proliferativo, ya que no se encontraron lesiones exudativas, excepto para los animales alimentados con ND y expuestos a MCI. Todos los animales no vacunados presentaron lesiones exudativas. Estas lesiones representaron ser el tipo de lesión mayoritario en los animales expuestos a SI.

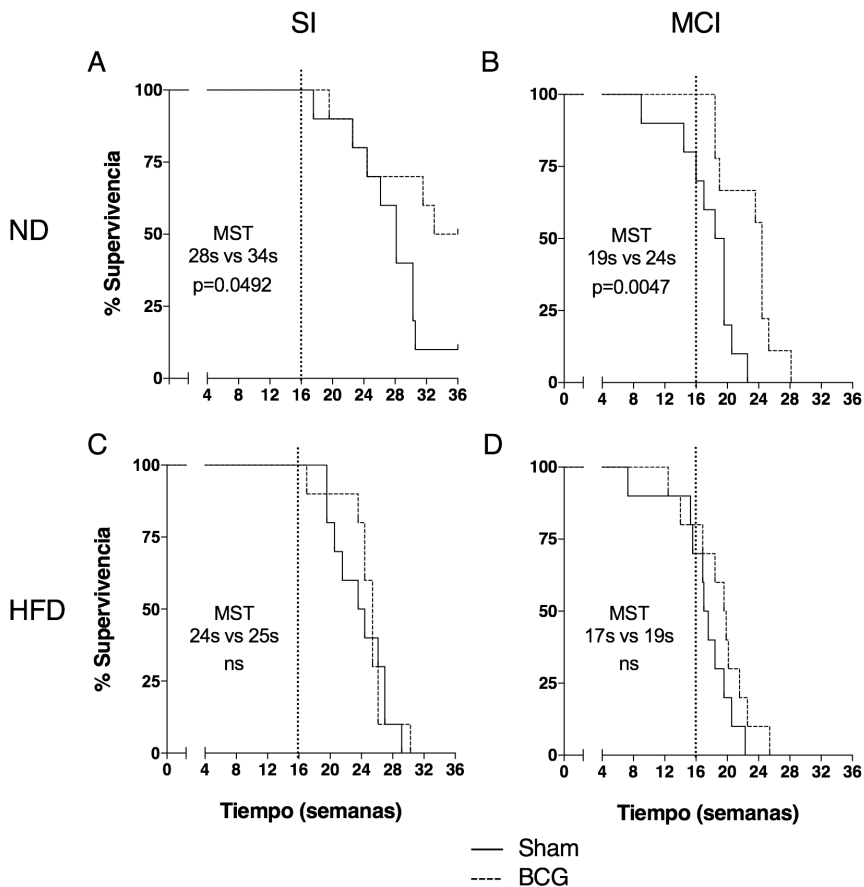
La naturaleza de la lesiones depende de la vacunación. A su vez, la infección influye en la cantidad de lesiones exudativas.



**Figura 17. Porcentaje de lesiones exudativas respecto al área lesionada total.** Los resultados de los animales ND están representados con barras negras y los HFD con barras rojas. Los \* marcan las diferencias entre el mismo tipo de dieta, las # simbolizan diferencias entre grupos con igual vacunación e infección pero distinta dieta. \* $p \leq 0.05$ , # $p \leq 0.05$ ; test Mann-Whitney.

#### 4.2.4. Supervivencia

Independientemente del tipo de infección a la que fueron expuestos los animales alimentados con ND, la BCG aumentó significativamente la supervivencia de los mismos (**Figura 18A, B**). Por el contrario, la supervivencia de los animales alimentados con HFD no aumentó significativamente con la vacunación con BCG (**Figura 18C, D**). La vacunación aumentó la supervivencia en los animales alimentados con ND pero no la de los alimentados con HFD.



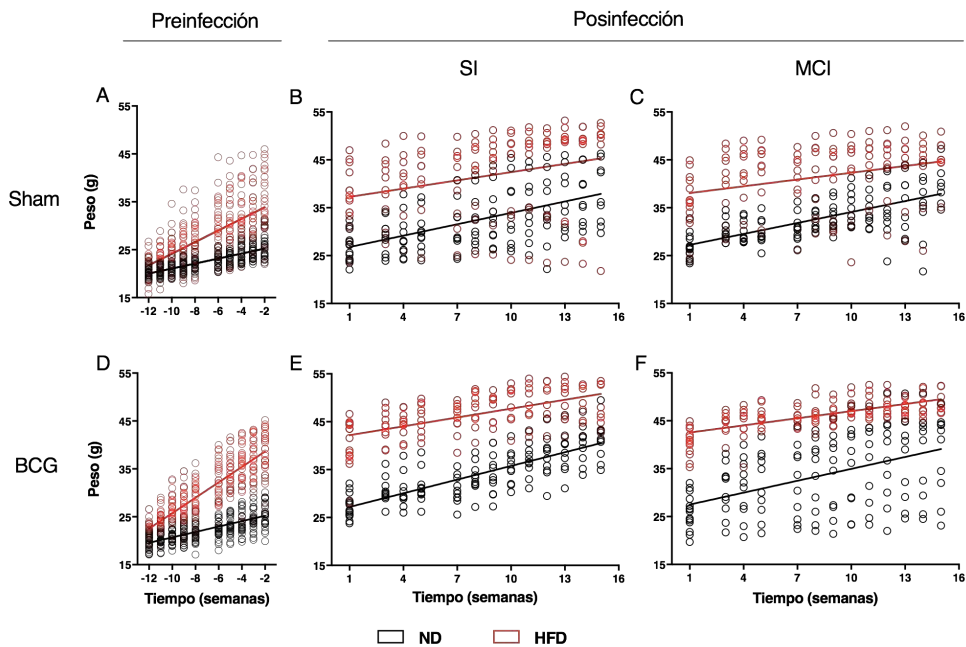
**Figura 18. Supervivencia de los animales después de la infección por *Mtb*.** Cada panel compara la supervivencia de los animales sham y la de los vacunados en las diferentes condiciones experimentales: ND y SI (A), ND y MCI (B), HFD y SI (C), HFD y MCI (D). Test Log-rank. (MST: tiempo medio de supervivencia, del inglés *median survival time*).

### 4.3. Efecto de la dieta en el desarrollo de la TB

El impacto de ambos tipos de dieta se ha analizado mediante el peso; la BL y la patología pulmonar, ambas a semana 3, 4 y 16 p.i.; y la supervivencia.

#### 4.3.1. Peso

El análisis del peso en función de la dieta mostró que, antes de la infección de los animales, la dieta influye de manera significativa en el peso de los animales, independientemente de la vacunación (**Figura 19A, D**).



**Figura 19. Evolución del peso de los animales según el tipo de dieta.** En cada panel se compara el peso de los animales alimentados con ND con el de los alimentados con HFD. Los paneles superiores describen los pesos de los animales sham divididos por el estado infección: preinfección (A) y posinfección. En posinfección se muestra dividido por el tipo de infección, SI (B) y MCI (C). Los paneles inferiores describen los pesos de los animales vacunados con BCG divididos por el estado de infección: preinfección (D) y posinfección. En posinfección se muestra dividido según el tipo de infección, SI (E) y MCI (F). Test de regresión lineal.

Por otro lado, el análisis de la influencia de la dieta posinfección mostró que el incremento es mayor en los animales ND, pese a que la media de los pesos de los animales HFD continuó siendo mayor (**Figura 19B, C, E, F**). A pesar de lo

anteriormente dicho, la diferencia en el aumento del peso cuando comparamos la dieta, solo fue significativo en los animales vacunados con BCG (**Tabla 5**).

El aumento de peso de los animales depende de la dieta. En preinfección, el incremento del peso los animales con HFD fue significativamente mayor que el de los ND. En posinfección, el incremento es ligeramente superior en los ND.

**Tabla 5.** Valores de la pendientes obtenidas mediante el análisis de regresión lineal de los diferentes grupos experimentales, comparando por tipo de dieta. El *p*-valor es resultado de la comparación obtenida mediante el test Mann-Whitney.

Grupos experimentales		Pendientes	<i>p</i> -valor
Preinfección	ND	0,521	<0,0001
	HFD	1,213	
	ND-BCG	0,565	<0,0001
	HFD-BCG	1,61	
Posinfección	ND-SI	0,793	0,270
	HFD-SI	0,574	
	ND-MCI	0,762	0,0683
	HFD-MCI	0,472	
	ND-BCG-SI	0,952	0,0012
	HFD-BCG-SI	0,616	
	ND-BCG-MCI	0,828	0,0301
	HFD-BCG-MCI	0,496	

#### 4.3.2. BL

Los resultados mostraron que la BL no presentó diferencias cuando se comparó por el tipo de dieta que recibieron los animales, independientemente del tipo de infección a la que fueron sometidos o el estado de vacunación. Por otro lado, la BL mostró un incremento progresivo a lo largo de las semanas en ambos tipos de dieta (**Tabla 6**).

#### 4.3.3. Patología pulmonar

Los resultados del análisis de la patología mostraron diferentes patrones de comportamiento (**Tabla 7**).

**Tabla 6.** Valores de la BL en pulmón comparando el tipo de dieta. Los valores indicados como mediana corresponden a la mediana del logaritmo de CFU por ml de tejido homogeneizado. Test Mann-Whitney.

	Semana 3		Semana 4		Semana 16	
	Mediana	<i>p</i> -valor	Mediana	<i>p</i> -valor	Mediana	<i>p</i> -valor
ND-SI	5,58	0,6905	6,15	0,0952	6,57	0,4807
HFD-SI	5,61		5,93		7,36	
ND-MCI	6,09	0,1508	6,92	>0,9999	7,60	0,1812
HFD-MCI	5,59		6,96		7,41	
ND-BCG-SI	4,53	0,0556	5,20	0,5476	5,72	0,2176
HFD-BCG-SI	5,10		5,59		6,04	
ND-BCG-MCI	5,40	0,1508	6,38	0,8413	6,63	0,0524
HFD-BCG-MCI	5,89		6,13		7,14	

Cuando se comparó la dieta en los animales no vacunados y expuestos a SI, se vio que inicialmente (semana 3 y semana 4) los animales alimentados con HFD presentaban una patología inferior a los animales alimentados con ND, pero esto se revirtió en la última semana de estudio. Por el contrario, cuando se observó la patología de los expuestos a MCI se vio un patrón de comportamiento opuesto durante las primeras semanas de estudio y una patología prácticamente similar para los dos tipos de dieta al final del estudio. Los resultados de los animales vacunados mostraron que los expuestos a SI presentaron mayor patología si fueron alimentados con HFD. En cambio, los expuestos a MCI no mostraron diferencias significativas.

**Tabla 7.** Porcentaje de área lesionada respecto al área total pulmonar comparando por tipo de dieta. Los valores de la tabla corresponden a la mediana del porcentaje de área lesionada y al *p*-valor obtenido de la comparación. Test Mann-Whitney.

	Semana 3		Semana 4		Semana 16	
	%	<i>p</i> -valor	%	<i>p</i> -valor	%	<i>p</i> -valor
ND-SI	0,09	0,0286	2,99	0,0286	26,25	0,0286
HFD-SI	0,05		0,25		29,45	
ND-MCI	0,9	0,0286	4,16	0,0286	42,85	0,4000
HFD-MCI	3,91		6,14		41	
ND-BCG-SI	0,02	0,0028	0,17	0,0286	10,6	0,0286
HFD-BCG-SI	1,49		2,25		14,75	
ND-BCG-MCI	4,29	0,2286	5,02	0,0571	32,65	0,3429
HFD-BCG-MCI	4,86		7,6		30,05	

El análisis de la influencia de la dieta en la formación de lesiones exudativas mostró que, en los animales no vacunados, los alimentados con HFD presentan mayor cantidad de lesiones exudativas independientemente del tipo de infección a la que fueron expuestos. En los animales vacunados, expuestos a SI y alimentados con ambos tipos de dieta, todas las lesiones resultaron ser de naturaleza proliferativa, mientras que los expuestos MCI, solo los alimentados con ND presentaron lesiones exudativas (**Figura 17**).

#### 4.3.4. Supervivencia

Finalmente, el análisis de la supervivencia en función de la dieta mostró una disminución significativa de ésta en los ratones alimentados con HFD expuestos a SI, independientemente del estado de vacunación. Los expuestos a MCI no presentaron diferencias significativas tanto si habían sido alimentados con ND o como con HFD. Pese a esto, los animales alimentados con HFD mostraron un MST menor que los alimentados con ND (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Supervivencia de los animales en función del tipo de dieta. Los valores que aparecen corresponden al MST y el *p*-valor obtenido de la comparación obtenida mediante el test Log-rank.

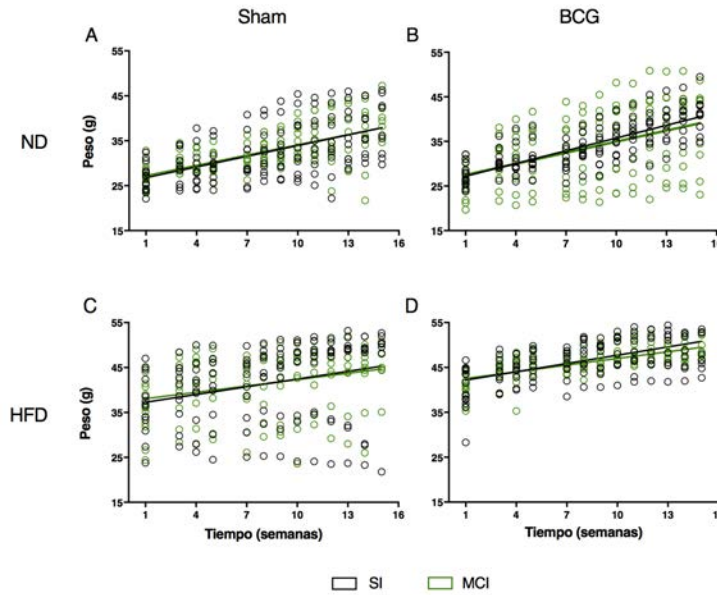
	MST (en semanas)	<i>p</i> -valor
ND-SI	28	0,0255
HFD-SI	24	
ND-MCI	19	0,4987
HFD-MCI	17	
ND-BCG-SI	34	0,0082
HFD-BCG-SI	25	
ND-BCG-MCI	24	0,0818
HFD-BCG-MCI	19	

#### 4.4. Análisis del tipo de infección en el desarrollo de la TB

De la misma manera que en las dos condiciones experimentales anteriores, el impacto del tipo de infección, SI y MCI, se ha evaluado mediante el peso; la BL y la patología pulmonar, ambas a semana 3, 4 y 16 p.i.; y la supervivencia.

#### 4.4.1. Peso

Después de la infección, no se observaron diferencias en la evolución del peso de los animales en función del tipo de infección a la que fueron sometidos. La evolución del peso se muestra en la **Figura 20** y las pendientes y las comparaciones en la **Tabla 9**.



**Figura 20. Evolución del peso de los animales según la infección.** En cada panel se compara el peso de los animales SI con el de los MCI. Los paneles superiores describen los pesos de los animales alimentados con ND: sham (A), BCG (B). Los paneles inferiores describen los pesos de los animales alimentados con HFD: sham (C) y BCG (D).

**Tabla 9.** Valores de la pendientes obtenidas mediante el análisis de regresión lineal de los diferentes grupos experimentales, comparando por el tipo de infección. El  $p$ -valor es resultado de la comparación obtenida mediante el test de Mann-Whitney

Grupos experimentales	Pendientes	$p$ -valor
ND-SI	0,793	0,8163
ND-MCI	0,762	
ND-BCG-SI	0,952	0,4386
ND-BCG-MCI	0,828	
HFD-SI	0,574	0,6381
HFD-MCI	0,472	
HFD-BCG-SI	0,616	0,1880
HFD-BCG-MCI	0,496	

#### 4.4.2. BL

La BL fue aumentando progresivamente a lo largo de las semanas y en mayor medida cuando los animales fueron expuestos a la MCI. En los animales sham y alimentados con HFD hay una progresión diferente de la BL en función de la infección. Los MCI muestran un incremento progresivo, mientras que los SI muestran un incremento más importante de semana 4 a semana 16. Los resultados y la estadística de las comparaciones realizadas se muestran en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Valores de la carga bacilar en pulmón comparando el tipo de infección. Los valores de la mediana corresponden a la mediana del logaritmo de CFU por ml de tejido homogeneizado. Test Mann-Whitney.

	Semana 3		Semana 4		Semana 16	
	Mediana	<i>p</i> -valor	Mediana	<i>p</i> -valor	Mediana	<i>p</i> -valor
ND-SI	5,58	0,0556	6,15	0,0159	6,57	0,0120
ND-MCI	6,09		6,92		7,60	
ND-BCG-SI	4,53	0,0079	5,20	0,0079	5,72	0,0002
ND-BCG-MCI	5,40		6,38		6,63	
HFD-SI	5,61	>0,9999	5,93	0,0079	7,36	0,4418
HFD-MCI	5,59		6,96		7,41	
HFD-BCG-SI	5,10	0,0159	5,59	0,2222	6,04	0,0039
HFD-BCG-MCI	5,89		6,13		7,14	

#### 4.4.3. Patología pulmonar

Independientemente de la vacunación y de la dieta, el análisis de la patología muestra que los animales expuestos a MCI presentan una mayor patología y, por consiguiente, una mayor área lesionada que los animales expuestos a SI. Además, la patología pulmonar incrementa a medida que transcurren las semanas de estudio (**Tabla 11**). Se observa una mayor patología pulmonar en los animales expuestos a un mayor número de infecciones.

El análisis del tipo de lesión que se genera en función de la infección muestra que la SI produce más lesiones exudativas en los animales sham. En cambio, en los animales vacunados se observan dos comportamientos en función de la dieta. En los animales alimentados con ND hay mayor número de lesiones exudativas en los MCI, mientras



que en los animales alimentados con HFD no se observaron lesiones de este tipo (Figura 17).

**Tabla 11.** Área pulmonar lesionada respecto al área total pulmonar comparando el tipo de infección. Los valores de la tabla corresponden a la mediana del porcentaje de lesión y al p-valor obtenido de la comparación. Test de Mann-Whitney.

	Semana 3		Semana 4		Semana 16	
	%	<i>p</i> -valor	%	<i>p</i> -valor	%	<i>p</i> -valor
ND-SI	0,09	0,0286	2,99	0,0286	26,25	0,0286
ND-MCI	0,9		4,16		42,85	
ND-BCG-SI	0,02	0,0028	0,17	0,0286	10,6	0,0286
ND-BCG-MCI	4,29		5,02		32,65	
HFD-SI	0,05	0,0286	0,25	0,0286	29,45	0,0286
HFD-MCI	3,91		6,14		41	
HFD-BCG-SI	1,49	0,0571	2,25	0,0286	14,75	0,0286
HFD-BCG-MCI	4,86		7,6		30,05	

#### 4.4.4. Supervivencia

El análisis de la supervivencia de los animales en función de la infección a la que fueron expuestos mostró que ésta se reducía significativamente en todos los casos cuando los animales fueron expuestos a MCI (Tabla 12).

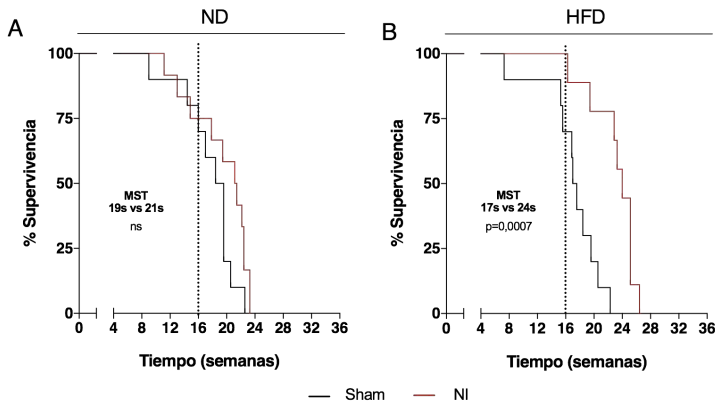
**Tabla 12. Supervivencia de los animales en función del tipo de infección.** Los valores que aparecen corresponden al MST y el *p*-valor obtenido de la comparación obtenida mediante el test Log-rank.

	MST (en semanas)	<i>p</i> -valor
ND-SI	28	0,0001
ND-MCI	19	
ND-BCG-SI	34	0,0035
ND-BCG-MCI	24	
HFD-SI	24	0,0003
HFD-MCI	17	
HFD-BCG-SI	25	0,0013
HFD-BCG-MCI	19	

#### 4.5. Análisis de la supervivencia con NI

Viendo los resultados que se obtuvieron con la vacunación con BCG, con el experimento 2 se quiso dilucidar qué diferencias de protección se podían observar si

comparábamos la vacunación con BCG y la NI. En la **Figura 21** se compara la supervivencia de los animales en los que se evaluó la NI de la de los animales sin tratamiento. Los animales alimentados con ND no mostraron diferencias de supervivencia entre las dos condiciones; en cambio, los animales alimentados con HFD mostraron un aumento de la supervivencia con la NI.



**Figura 21. Análisis de la supervivencia en la NI.** En cada panel se compara la supervivencia de los animales no tratados, representados con línea negra, y de los animales con NI, representados con línea roja, en la diferentes dietas: (A) ND y (B) HFD. Test log-rank.

Una vez obtenidos estos resultados, si los comparamos con los obtenidos con la vacunación con BCG, observamos que la BCG aumentó la supervivencia en animales alimentados con ND, mientras que la NI aumenta la supervivencia en los alimentados con HFD (**Tabla 13**).

**Tabla 13. Supervivencia de los animales comparando la vacunación con BCG y la NI.** Los valores representados corresponden al MST en animales sham (a), vacunados con BCG (b) y con NI (c) en los diferentes tipos de dieta y el *p*-valor de las diferentes comparaciones obtenidas mediante el test Log-rank.

	MST (en semanas)	<i>p</i> -valor (a vs b)	<i>p</i> -valor (a vs c)
(a) ND-MCI	19		
(b) ND-BCG-MCI	24	0,0047	0,1380
(c) ND-NI	21		
(a) HFD-MCI	17		
(b) HFD-BCG-MCI	19	0,1833	0,0007
(c) HFD-NI	24		

#### 4.6. Respuesta inmunológica del experimento 1

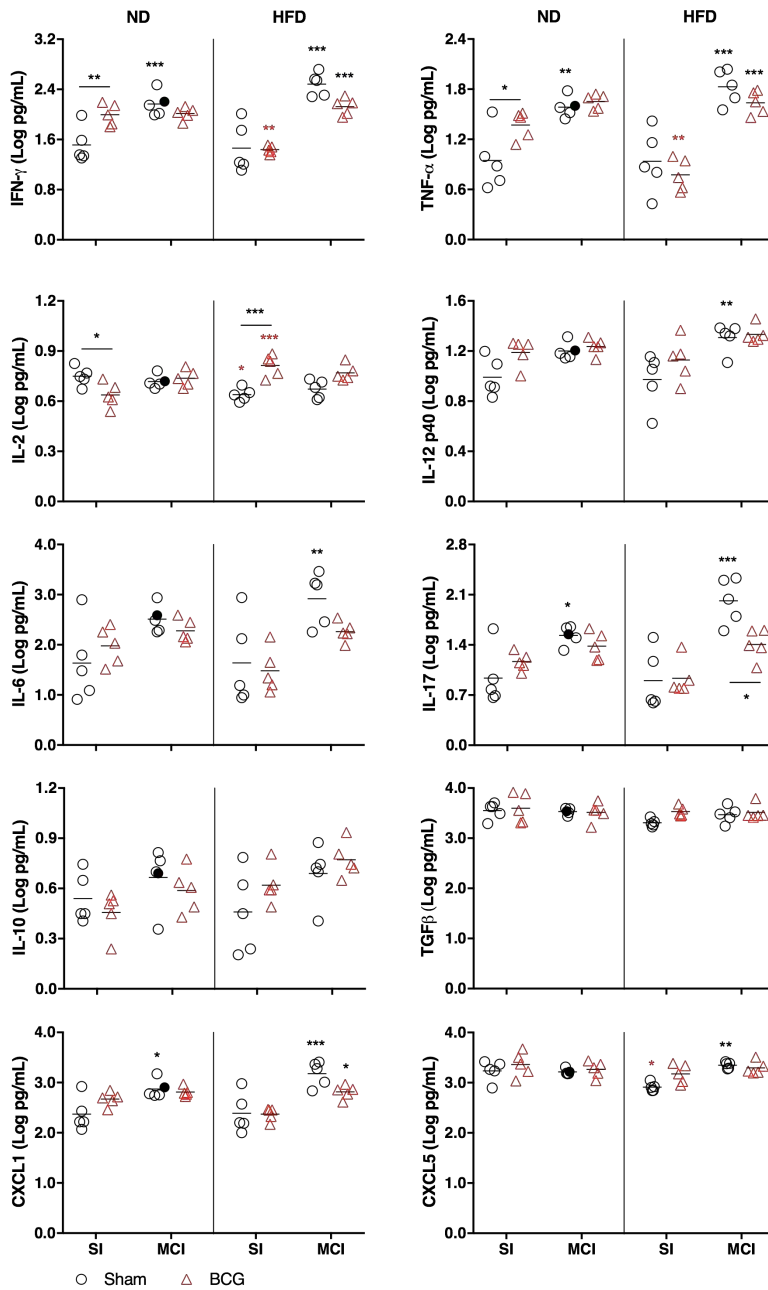
Se realizó el análisis del perfil de citoquinas y quimiocinas de los diferentes grupos experimentales mediante el test ANOVA de tres vías. Con él, se analiza de manera conjunta cuál es la influencia de los tres factores de estudio en la respuesta (**Tabla 14**). Como se puede observar, el factor que contribuye de manera más significativa en la variación entre citoquinas y quimiocinas es la infección. La dieta no contribuye a la variación de ninguna de los mediadores inflamatorios y las citoquinas que presentaron una variación de manera significativa con la vacunación con BCG fueron IL-2 e IL-12.

También se muestra las interacciones entre diferentes factores. La primera interacción muestra que los niveles de determinados mediadores (IFN- $\gamma$ , CXCL-5, IL-17, CXCL-1 y TNF- $\alpha$ ) varían según la infección y el cambio no es igual para ambos tipos de dieta. La segunda nos dice que los mediadores niveles de IFN- $\gamma$ , IL-17 y CXCL-1 cambian según la infección y esta variación no es igual dependiendo del estado de vacunación. La tercera nos dice que los niveles de IFN- $\gamma$ , IL-2, CXCL1 y TNF- $\alpha$  cambian según la dieta y este cambio es distinto dependiendo del estado de vacunación. Finalmente, la última interacción es la que tiene en cuenta la interacción de los tres factores de estudio en la variación de los niveles de citoquinas y en los que solo se encuentra una variación significativa en el caso de IL-2.

La representación de los valores de cada animal para cada citoquina se encuentra en la **Figura 22**. Se encontraron niveles más altos de citoquinas proinflamatorias en los animales MCI y, dentro de este patrón, se ha visto que en IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 este incremento fue mayor en animales con HFD. De hecho, entre los animales SI, estos mediadores presentan valores más elevados en los animales con ND y el patrón se ve revertido en MCI. Este mismo comportamiento se observó cuando se analizaron las quimiocinas CXCL1 y CXCL5. En lo que respecta a las citoquinas antiinflamatorias, no se encontraron diferencias.

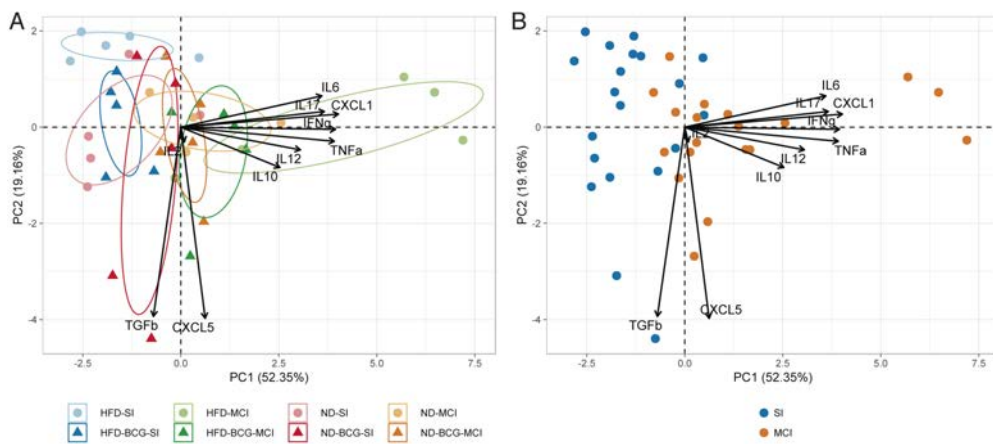
**Tabla 14. Resultados del análisis ANOVA de 3 vías.** \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

<b>Fuente de variabilidad</b>	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-6	IL-10	IL-12	CXCL5	IL-17	CXCL1	TNF- $\alpha$	TGF- $\beta$
Infección	***	ns	***	**	***	*	***	***	***	ns
Dieta	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BCG	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
Infección x Dieta	***	ns	ns	ns	ns	**	*	*	**	ns
Infección x BCG	**	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns
Dieta x BCG	*	***	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns
Infección x Diet x BCG	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns



**Figura 22. Análisis de los mediadores inflamatorios en tejido pulmonar a semana 4 p.i.** Los resultados son representados como el Log<sub>10</sub> de la concentración en pg/ml. Las comparaciones se encuentran indicadas de manera diferente dependiendo de la condición experimental analizada: línea y asterisco (vacunación), asterisco negro (infección), asterisco rojo (dieta). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; Test de múltiples comparaciones Holm Sidak's.

Además, se realizó un PCA para analizar la contribución de todos los mediadores inflamatorios en las diferentes condiciones experimentales. Los dos primeros componentes contribuyen al 71,51% de la varianza (**Figura 23**). La contribución en PC1 viene dada principalmente por CXCL1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-6. Por otro lado, el PC2 se explica mayormente por CXCL5 y TGF- $\beta$ . El grupo HFD-MCI presentó los valores más altos de PC1 y el grupo HFD-SI presentó los valores más altos de PC2 (**Figura 23A**). Lo que podemos concluir de este análisis y, en concordancia con lo observado con el test ANOVA de tres vías, es que la infección es el factor que tiene mayor influencia entre las muestras (**Figura 23B**).



**Figura 23. PCA de los mediadores inflamatorios.** (A) Representación de los animales según sus grupos experimentales con elipses al 95% de confianza. (B) Muestras coloreadas por el tipo de infección.

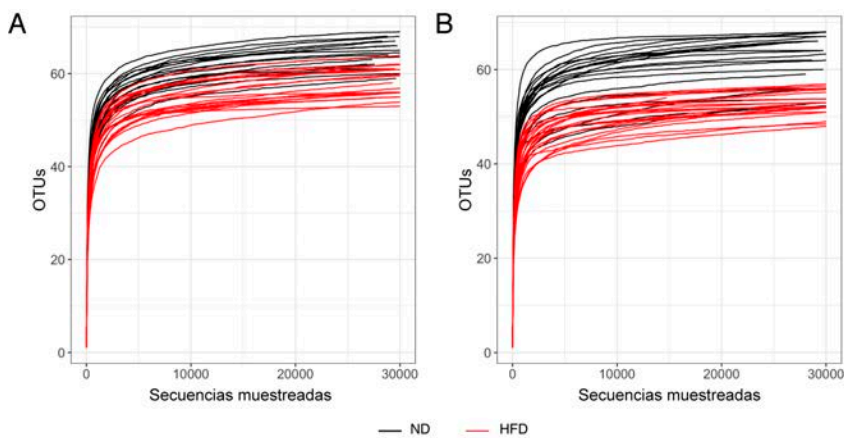
#### 4.7. Análisis de la microbiota intestinal

El análisis de la microbiota intestinal se realizó mediante la secuenciación del gen 16S rRNA en muestras de semana 4 y 16 p.i. del experimento 1 y en muestras de semana 4 p.i. del experimento 2.

Estos tiempos experimentales corresponden a semana 16 y semana 28 después del inicio de la dieta. Se han analizado las curvas de rarefacción, la disimilitud entre muestras, los índices de diversidad y la clasificación taxonómica de los OTUs encontrados.

### 4.7.1. Experimento 1

La primera aproximación para evaluar el proceso de secuenciación es ver las curvas de rarefacción, donde se grafican el número de OTUs encontrados en función del número de secuencias muestreadas, con la finalidad de determinar si se ha realizado suficiente esfuerzo de secuenciación (**Figura 24**). De esta manera, conseguir llegar a una fase de *plateau* nos asegura que secuenciar más muestras no aumentará de una manera significativa el número de OTUs encontrados.

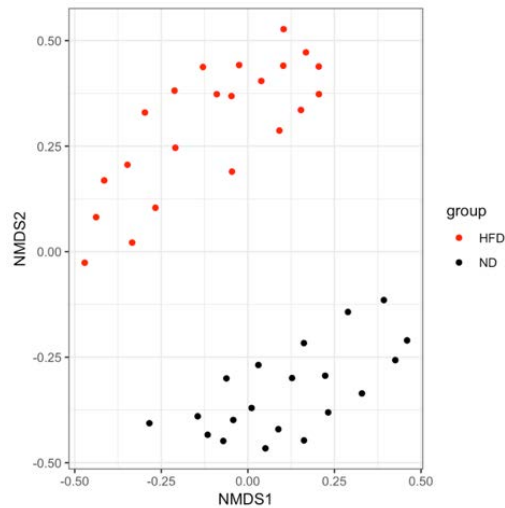


**Figura 24.** Curvas de rarefacción a semana 4 (A) y semana 16 (B) p.i..

Se observó que, para ambas semanas de estudio, el número de OTUs en las muestras provenientes de los animales alimentados con HFD era menor en comparación a las muestras provenientes de los animales alimentados con ND. Además, mientras que el número de OTUs encontrados en muestras de animales alimentados con ND fue prácticamente el mismo tanto para semana 4 como para semana 16, en los animales alimentados con HFD se observó una reducción en semana 16.

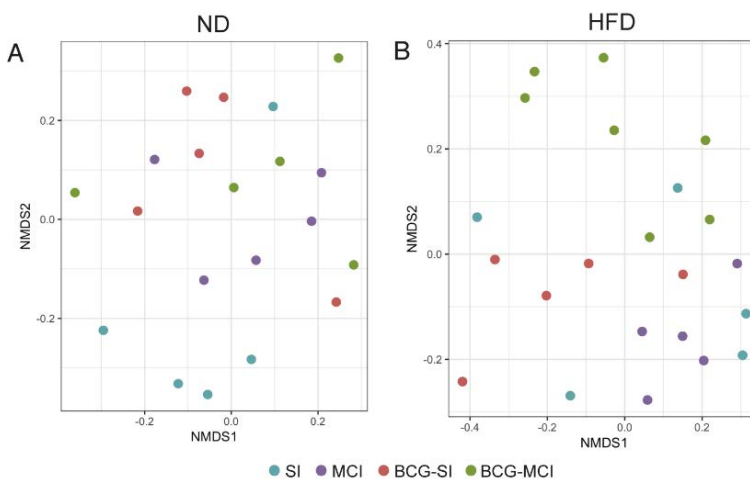
Una vez vista la diferencia existente en el número de OTUs en cada dieta, se utilizó el índice de Bray-Curtis para calcular una matriz de distancias entre las muestras y con esto comprobar disimilitud entre ellas. La visualización de la disimilitud entre las muestras se realizó utilizando el NMDS. En primer lugar, se confirmó el resultado observado de manera indirecta en el apartado anterior la mayor distancia entre las

muestras era debido al factor dieta y no entre las otras condiciones experimentales. Este resultado ha sido observado en ambas semanas de estudio (**Figura 25**).



**Figura 25.** NMDS y disimilitud entre muestras a semana 16.

En segundo lugar, y una vez vista la importancia del factor dieta, se calculó la matriz de distancias de nuevo para cada una de las dietas y así poder ver la contribución de la infección y la vacunación en la microbiota intestinal. Los resultados del análisis no mostraron un patrón de disimilitud por infección y/o por vacunación (**Figura 26**).

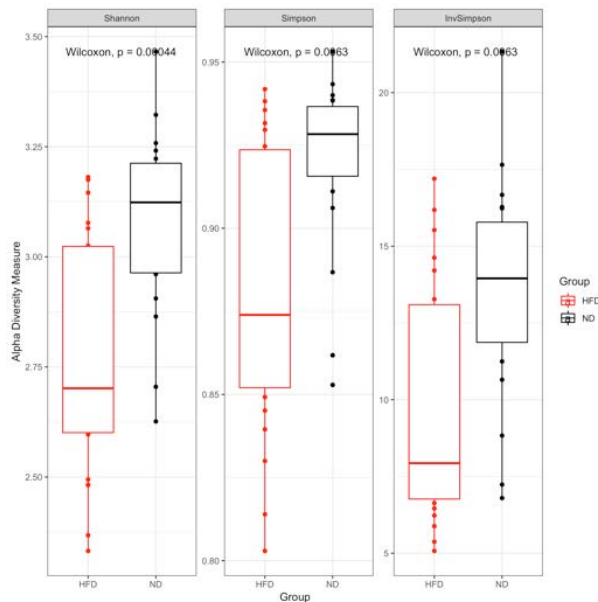


**Figura 26.** Análisis de disimilitud por dietas. NMDS y disimilitud por dietas.



Una vez vista la disimilitud entre los grupos bajo diferentes dietas, se calcularon los índices de diversidad de Shannon, Simpson e Inverso de Simpson para cada uno de los grupos. El índice de Shannon representa el número de especies encontradas en los diferentes grupos. El índice de Simpson y el inverso de Simpson describen el tipo de especies que se encuentran en la microbiota de los distintos grupos y las diferencias entre ellos.

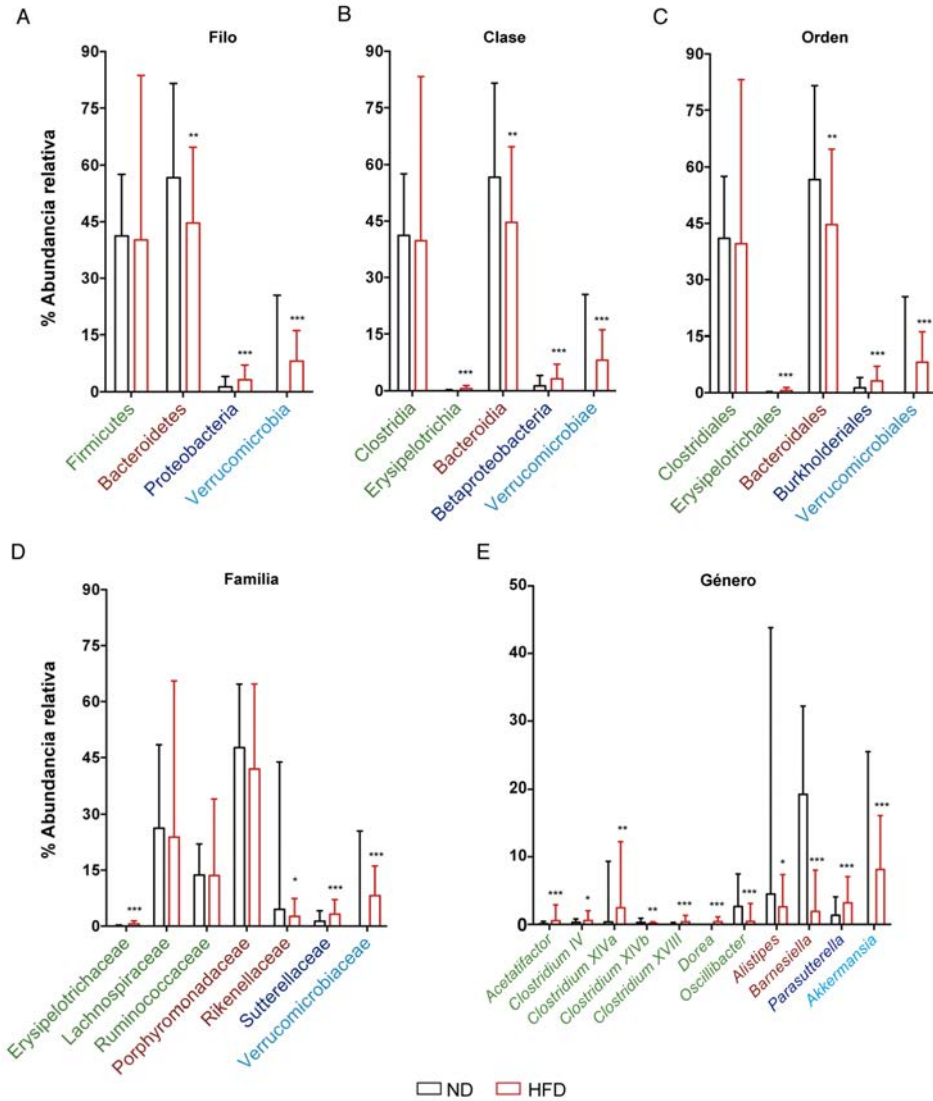
Se analizaron los índices de diversidad, tanto a semana 4 como a semana 16 p.i., representando las diferencias entre la cantidad de especies y el tipo de especies de la microbiota de los animales con los dos tipos de dieta. Los animales alimentados con HFD presentaron índices de diversidad más bajos que los alimentados con ND (**Figura 27**).



**Figura 27. Análisis de la diversidad entre dietas.** Índices de Shannon, Simpson e Inverso de Simpson analizados en la microbiota intestinal a semana 16 de animales alimentados con ND (negro) y HFD (rojo). Test de Mann-Whitney.

Finalmente, se analizaron las clasificaciones taxonómicas de los OTUs encontrados en los animales alimentados con ND y los alimentados con HFD. Las clasificaciones se realizaron tanto a semana 4 (**Figura 28**) como a semana 16 (**Figura 29**). Los

taxones analizados fueron filo, clase, orden, familia y género donde cada secuencia fue clasificada hasta el taxón más inclusivo posible.



**Figura 28. Análisis taxonómico de la microbiota intestinal a semana 4.** Cada panel muestra un nivel taxonómico. El código de colores indica la pertenencia al mismo taxón del nivel anterior. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; Test de Mann-Whitney

El análisis, tanto a semana 4 como a semana 16, mostró que a nivel de filo hay una reducción de Bacteroidetes en animales alimentados con HFD. El porcentaje de

Firmicutes no varía entre dietas y semanas de estudio y los niveles de Proteobacteria y Verrucomicrobia fueron mayores en HFD. Finalmente, a semana 16 se observó la aparición del filo Deferribacteres, con una abundancia mayor en HFD (**Figura 28A y Figura 29A**). A nivel de clase y orden, la distribución fue bastante similar a lo encontrado en el análisis de los filos (**Figura 28B, C y Figura 29B, C**).

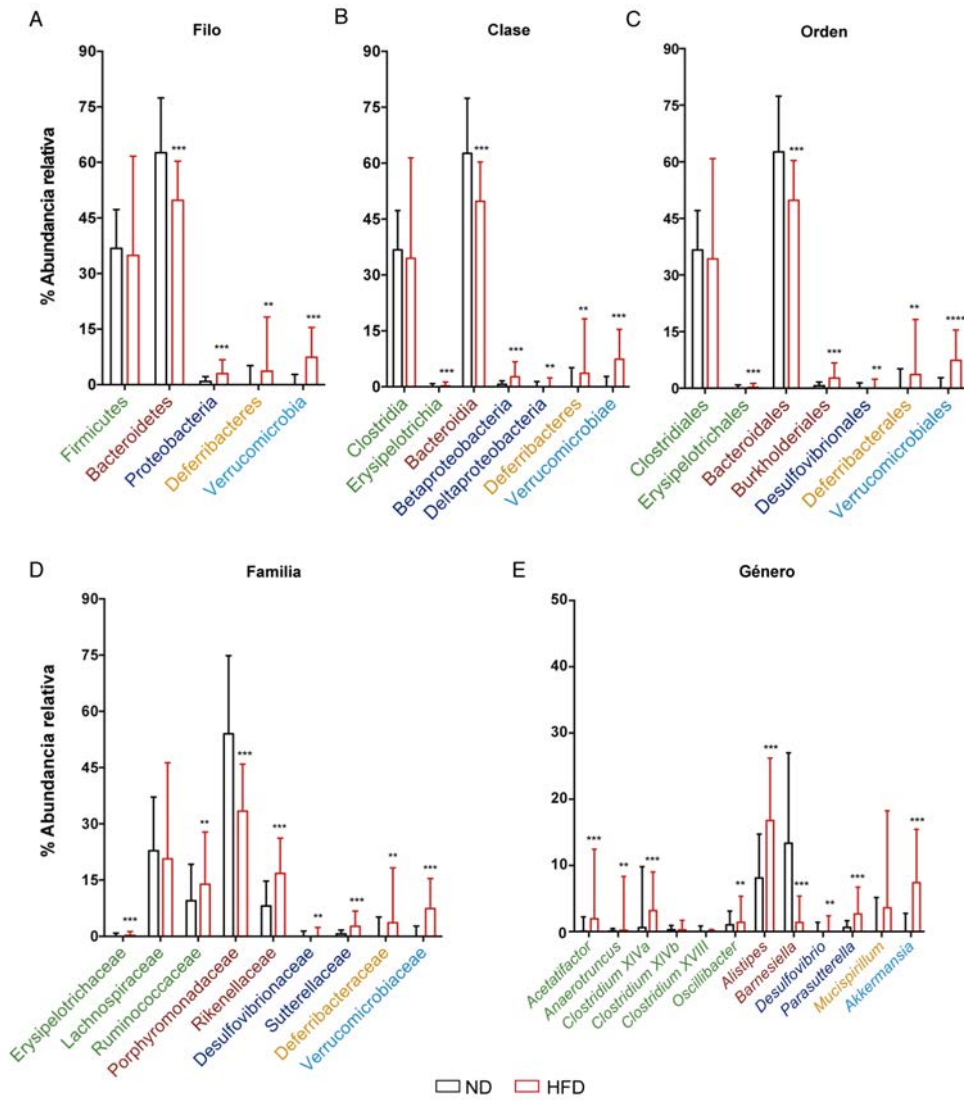
En cuanto al análisis a nivel de familia cabe destacar que la mayoría de los Firmicutes encontrados pertenecían a las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. Este último tiene un % mayor en HFD a semana 16. Las familias Porphyromonadaceae y Rikenellaceae, esta último en menor medida, fueron las encontradas del filo Bacteroidetes. A semana 16 se observó una reducción del % de Porphyromonadaceae en animales alimentados con HFD (**Figura 28D y Figura 29D**).

En cuanto a los géneros del filo Firmicutes, los más abundantes a semana 4 fueron *Acetatifactor*, *Clostridium IV*, *Clostridium XIVa*. A semana 16 lo fueron *Acetatifactor*, *Clostridium XIVa* y *Oscillibacter*. También se detectó la presencia *Anaerotruncus* y desaparecieron los géneros *Clostridium IV* y *Dorea* (**Figura 28E y Figura 29E**).

Por otro lado, los géneros del filo Bacteroidetes encontrados fueron *Alistipes* y *Barnesiella*. Se encontró menor abundancia de *Alistipes* en animales alimentados con HFD a semana 4, pero presentó un aumento significativo a semana 16. En ambas semanas de estudio, los niveles de *Barnesiella* fueron menores en los animales alimentados con HFD.

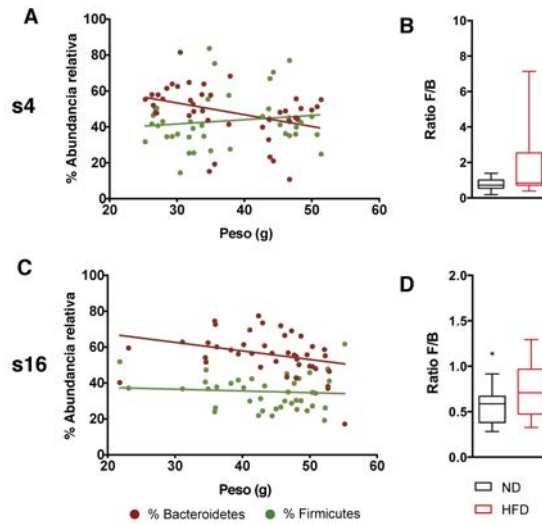
Finalmente, resulta interesante remarcar el alto porcentaje de *Akkermansia* encontrado en muestras de animales alimentados con HFD, en ambas semanas; y la aparición de *Mucispirillum* a semana 16 especialmente en HFD (**Figura 28E y Figura 29E**).

Como hemos observado, la microbiota intestinal de los ratones estaba compuesta principalmente por los filos Firmicutes y Bacteroidetes.



**Figura 29. Análisis taxonómico de la microbiota intestinal a semana 16.** Cada panel muestra un nivel taxonómico. El código de colores indica la pertenencia al mismo taxón del nivel anterior. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; Test de Mann-Whitney

El análisis de la correlación entre la abundancia de los dos filos en función del peso de los animales, mostró una disminución del porcentaje de Bacteroidetes a medida que incrementa el peso de los animales, a semana 4 y a semana 16 ( $p=0,0056$  y  $p=0,0026$ , respectivamente) (Figura 30A, C). La ratio F/B a semana 16 es mayor en animales alimentados con HFD (Figura 30D).



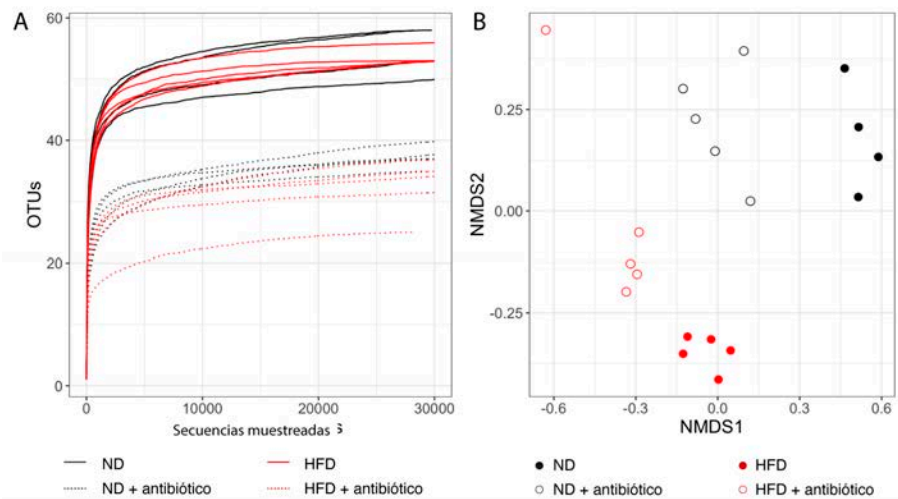
**Figura 30. Análisis de Firmicutes y Bacteroidetes.** (A, C) Análisis del porcentaje de Firmicutes y Bacteroidetes en función del peso. (B, D) Ratio F/B. \* $p \leq 0,05$ ; test de Mann-Whitney.

#### 4.7.2. Experimento 2

El análisis de la microbiota intestinal en este experimento consistía en ver los cambios producidos por la dieta, comparados con los producidos con la dieta y la NI inducida con tratamiento antibiótico. Se han analizado las curvas de rarefacción, la disimilitud entre muestras, los índices de diversidad y la clasificación taxonómica de los OTUs encontrados.

En este experimento, con el análisis de las curvas de rarefacción se observaron menos número de OTUs en los animales que siguieron tratamiento antibiótico. Además, se detectaron menos OTUs en los animales alimentados con HFD y tratamiento antibiótico en comparación con los ND con tratamiento antibiótico (**Figura 31A**).

Una vez visto la reducción en el número de OTUs con el tratamiento antibiótico, se calculó una matriz de distancias para ver la disimilitud de las muestras. Se observó la distancia entre dietas y, además, el tratamiento antibiótico modifica la microbiota intestinal de manera que aumenta la distancia de las muestras de animales con una misma dieta en función del tratamiento antibiótico (**Figura 31B**).

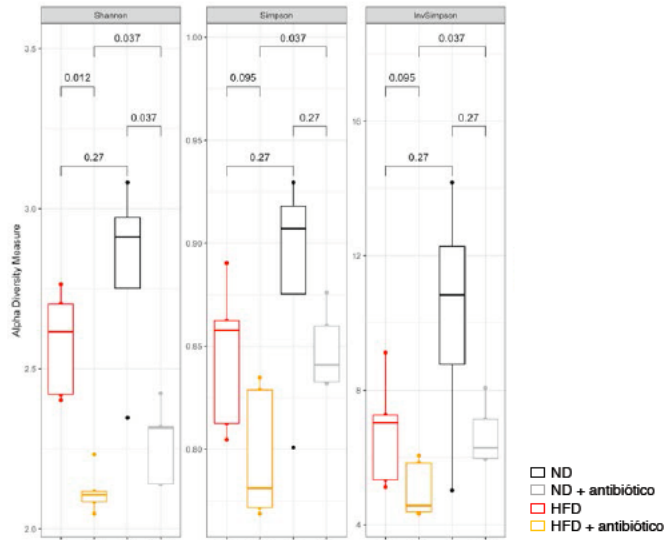


**Figura 31. Análisis de la microbiota intestinal según dieta y tratamiento antibiótico a semana 4 (experimentos 1 y 2).** (A) Curvas de rarefacción. (B) NMDS y disimilitud entre muestras

El análisis de los índices de diversidad se muestra en la **Figura 32**. Con el índice de Shannon se observó que el tratamiento antibiótico redujo significativamente el número de especies en ambos tipos de dieta. También se detectó una reducción en el número de especies en los animales alimentados con HFD, cuando se compararon ambas dietas con tratamiento antibiótico. Por el contrario, sin tratamiento antibiótico, no se observaron diferencias entre dietas.

Por otro lado, con los índices de Simpson e inverso de Simpson se observó que el tipo de especies fue bastante similar en cada una de las dietas con y sin tratamiento antibiótico. Por consiguiente, el tratamiento antibiótico redujo la cantidad pero no el tipo de especies. También se observó que el tipo de especies era diferente cuando se compararon las dietas con tratamiento antibiótico, pero no cuando se compararon ambas dietas sin tratamiento antibiótico.

La clasificación taxonómica de los OTUs se encuentra representada en la **Figura 33**. En los animales ND se observó una reducción de Firmicutes y un incremento de Bacteroidetes con el tratamiento antibiótico.



**Figura 32.** Análisis de la diversidad entre dietas. Índices de Shannon, Simpson e Inverso de Simpson analizados en la microbiota intestinal a semana 16 de animales según dieta y tratamiento antibiótico. Test de Mann-Whitney.

En cambio, en los animales alimentados con HFD no se observaron diferencias significativas en estos dos filis, aunque si se observó la misma tendencia. Además, se detectó un incremento significativo del filo Verrucomicrobia con el tratamiento antibiótico en animales alimentados con ND (**Figura 33A**).

Las familias más abundantes para el filo Firmicutes fueron Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. Con el tratamiento antibiótico se observó una disminución de ambas familias, en los dos tipos de dieta. La familia predominante del filo Bacteroidetes fue Porphyromonadaceae con un incremento con el tratamiento antibiótico, aunque solamente significativo en ND (**Figura 33D**).

A nivel de género cabe destacar el aumento significativo de *Akkermansia* con el tratamiento antibiótico en ND y la reducción de *Alistipes* con el tratamiento antibiótico en ambas dietas (**Figura 33E**).

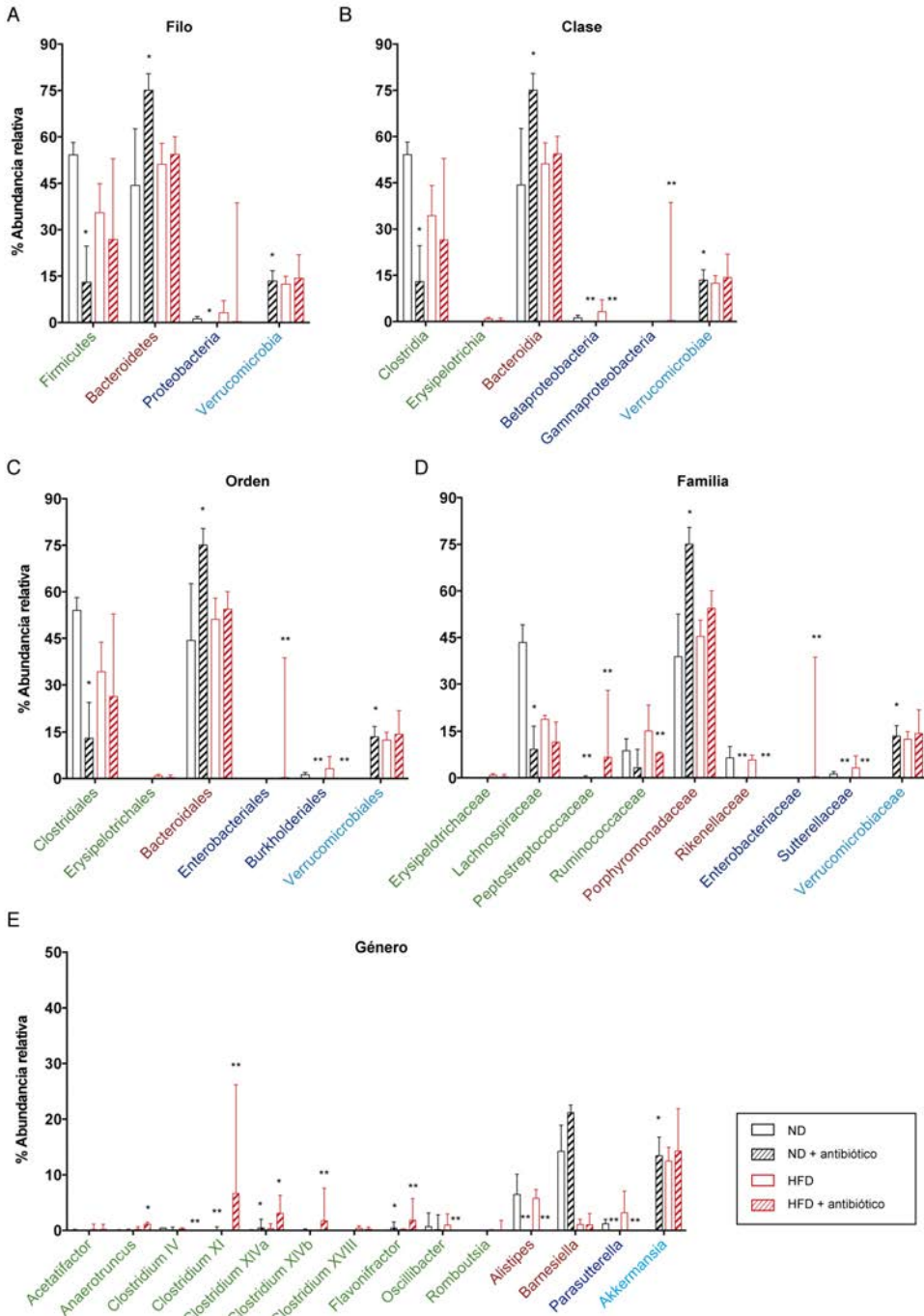


Figura 33. Análisis taxonómico de la microbiota intestinal a semana 4 según dieta y tratamiento antibiótico. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; Test Mann-Whitney.



## 5. RESULTADOS (ESTUDIO II)



El estudio II está formado por 3 experimentos. En estos experimentos se evaluó la infección i.v. con dos lotes al observar diferencias de supervivencia en animales infectados con la misma dosis de *Mtb* de la cepa Pasteur H37Rv.

En primer lugar se analizaron las agregaciones de bacteria a partir de gotas de ambos lotes. A continuación, se realizaron 3 experimentos infectando ratones con ambos lotes. El primer experimento representó la prueba de concepto de que los dos lotes de *Mtb* muestran un patrón diferente de evolución de TB. En el segundo y tercer experimento se evaluaron los dos lotes y las protecciones de la vacunación con BCG y de una infección LDA. En los tres experimentos se analizaron, a día 17, 21 y 24 p.i., la BL, la patología y el perfil inmunológico pulmonares. Además se analizaron los agregados de bacteria mediante SEM en un pulmón infectado con *Mtb*.

### 5.1. Análisis de los agregados de bacteria

Se analizaron las imágenes de las gotas a partir del cultivo de los dos lotes, teñidas mediante la técnica Ziehl-Neelsen. El análisis se realizó contando los puntos, mediante un software automático, que representaban bacilos sueltos o agregados.

En la **Tabla 15** se muestran los resultados de la media de todas las imágenes tomadas por lote. Se detectaron menos puntos en el lote 10 con respecto al lote 11. Pese a eso, tanto el área media como el área total de los puntos del lote 10 fueron mayores que los del lote 11 (**Figura 34**). Pese a que el lote 10 posea mayor área total, y por consiguiente más cantidad de bacteria, la titulación de ambos lotes mostró la misma cantidad de CFU. La bacteria en el lote 10 se encuentra formando más agregados en comparación al lote 11.

**Tabla 15. Análisis de las imágenes de las gotas de los cultivos de lote 10 y lote 11.**

	Número de puntos	Área media ( $\mu\text{m}^2$ )	Área total ( $\mu\text{m}^2$ )
Lote 10	163	190	10800
Lote 11	526	15	5500

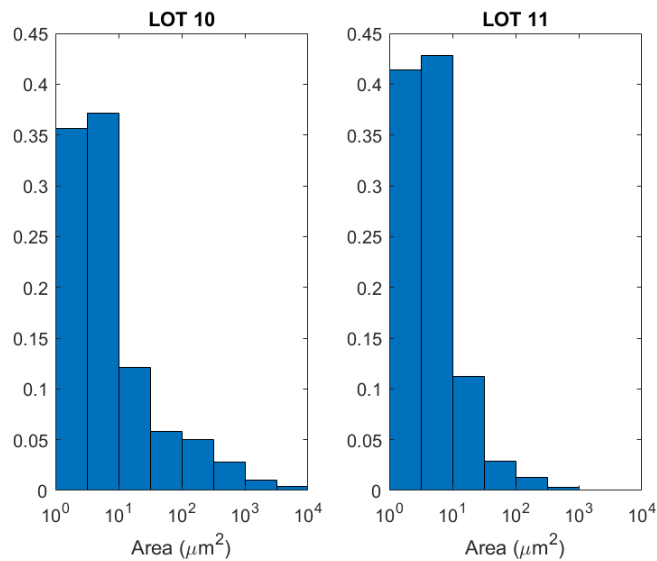


Figura 34. Representación de las áreas de los puntos en lote 10 y lote 11.

## 5.2. BL

### 5.2.1. Experimento 1

Los resultados de la carga bacilar mostraron que a día 17, 21 y 24 p.i., en los animales infectados con el lote 10 se observó una BL superior comparado con los infectados con el lote 11, pese a haber sido infectados con la misma dosis (Figura 35).

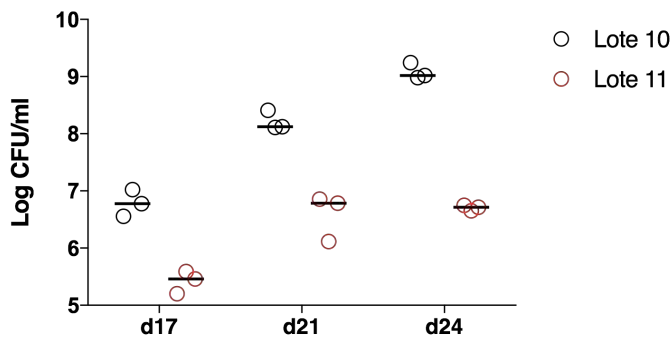


Figura 35. Análisis de la BL en dos lotes de *Mtb* con infección intravenosa. Test Mann-Whitney.

### 5.2.2. Experimento 2

Vistos estos resultados, se decidió analizar qué sucede si se vacuna con BCG a los animales y, posteriormente, se infectan con los dos lotes de *Mtb*. Los resultados mostraron, como el experimento anterior, que la carga bacilar fue superior en el lote 10 comparado con el lote 11 y la dinámica de crecimiento de la BL pulmonar fue diferente para ambos lotes. El lote 10 mostró un aumento progresivo de la BL, mientras que el lote 11 presentó unos valores estables en los tres días de estudio. En segundo lugar, la BCG disminuyó significativamente la BL en ambos lotes y en los 3 tiempos de estudio analizados. Finalmente, se observó que la BL de los animales infectados con lote 11 fue similar a la de los animales vacunados con BCG e infectados con el lote 10 (Figura 36).

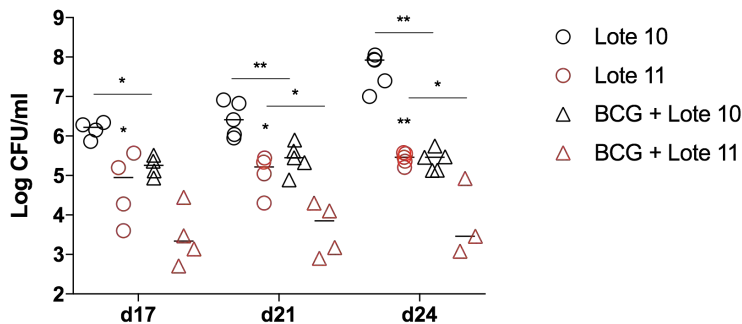


Figura 36. Evolución de la BL en el experimento 2. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; Test Mann-Whitney.

### 5.2.3. Experimento 3

En el experimento 3 se evaluó cuál era el efecto de una infección LDA con *Mtb* previa a una infección vía i.v. con *Mtb* (Figura 37). Los resultados muestran, en primer lugar, un aumento similar de la BL con el avance de la infección en ambos lotes. Aun así, la BL del lote 10 fue mayor que la del lote 11 en todos los días de estudio. En segundo lugar, una infección LDA previa a la infección i.v. disminuyó la BL de manera similar a la vacunación con BCG.

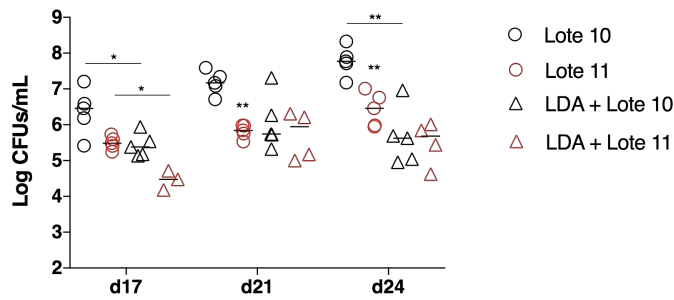


Figura 37. Evolución de la BL en el experimento 3. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; Test Mann-Whitney.

### 5.3. Patología pulmonar

#### 5.3.1. Experimento 1

En el primer experimento, se observó que la patología pulmonar no aumentó en los animales infectados con el lote 11 a lo largo de los días de estudio. En cambio, los animales infectados con el lote 10 mostraron un aumento del porcentaje de área lesionada a medida que avanzaba la infección (**Figura 38**).

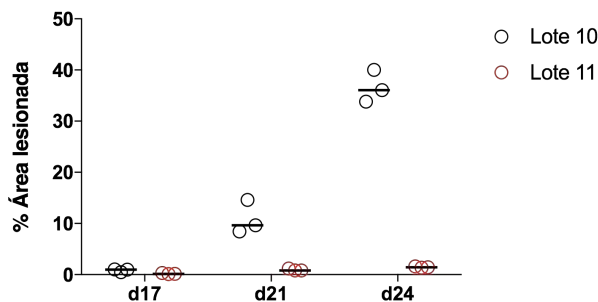


Figura 38. Evolución de la patología pulmonar en el experimento 1. Test Mann-Whitney.

#### 5.3.2. Experimento 2

En el experimento 2, en el que se evalúan los dos lotes de *Mtb* y la protección de la BCG, vemos nuevamente que el incremento de la patología pulmonar es mínimo con el lote 11, mientras que se observó un aumento progresivo de la patología pulmonar con el lote 10. Los análisis no mostraron diferencias de patología con la vacunación

en el lote 11, mientras que con el lote 10 se observó mayor patología con la vacunación a día 21 y una reducción de ésta a día 24 (Figura 39 y Figura 40).

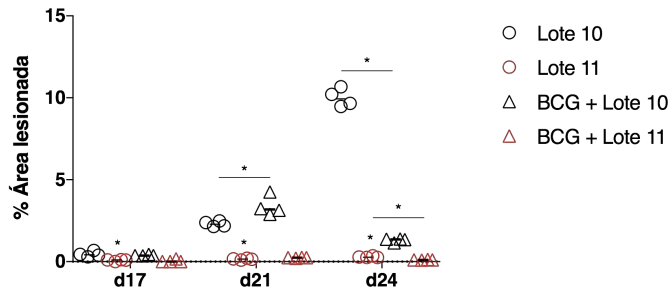


Figura 39. Evolución de la patología pulmonar en el experimento 2. \* $p \leq 0,05$ ; Test Mann-Whitney.

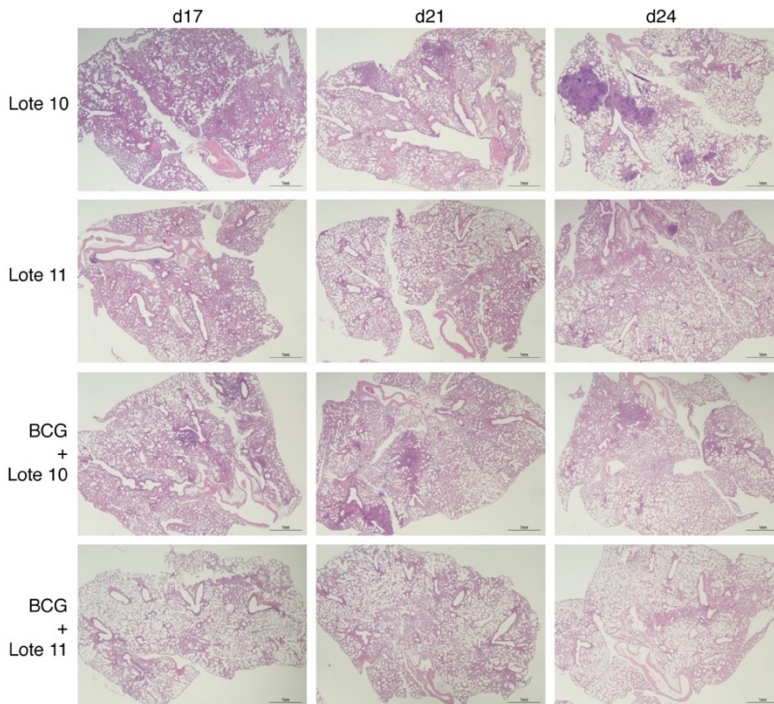
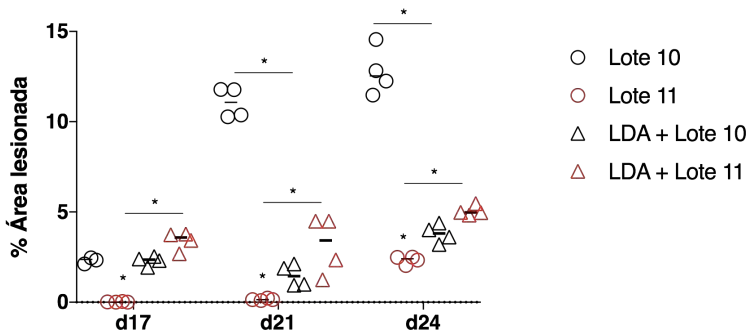


Figura 40. Cortes histológicos de pulmones de animales vacunados con BCG e infectados vía i.v. con diferentes lotes *Mtb*. Barra de escala = 1mm

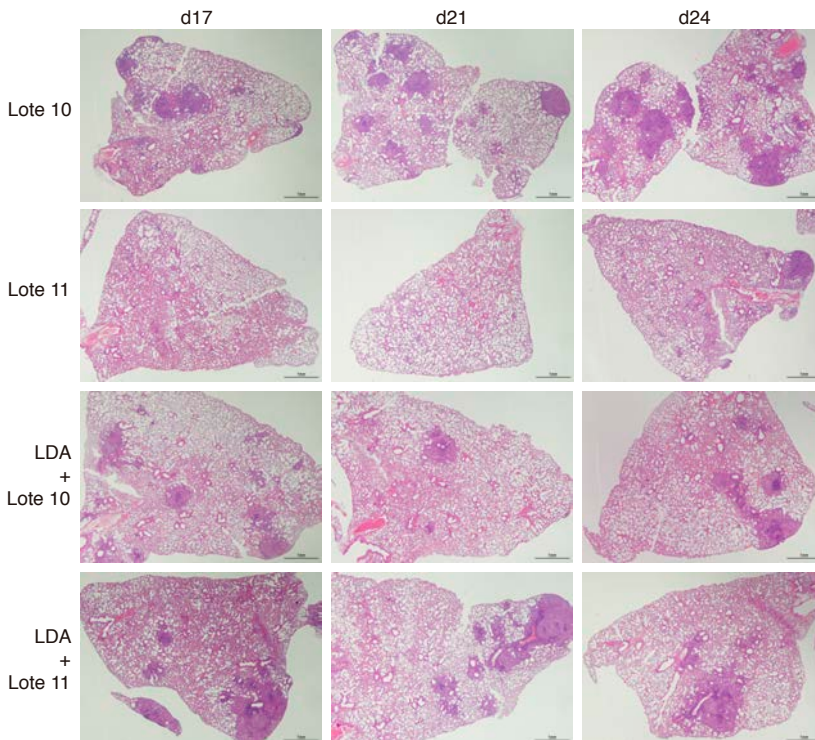
### 5.3.3. Experimento 3

En el experimento 3 hemos visto que la patología con el lote 10 aumentó progresivamente, pero realizando una LDA previa a la infección i.v., los animales

fueron capaces de controlar la patología pulmonar, de la misma manera como se observó con la BCG. En cambio, con el lote 11 se observó un mayor porcentaje de lesión cuando se realizó una LDA previa a la infección i.v. (**Figura 41** y **Figura 42**).



**Figura 41.** Evolución de la patología pulmonar en el experimento 3. \* $p \leq 0,05$ ; Test Mann-Whitney.



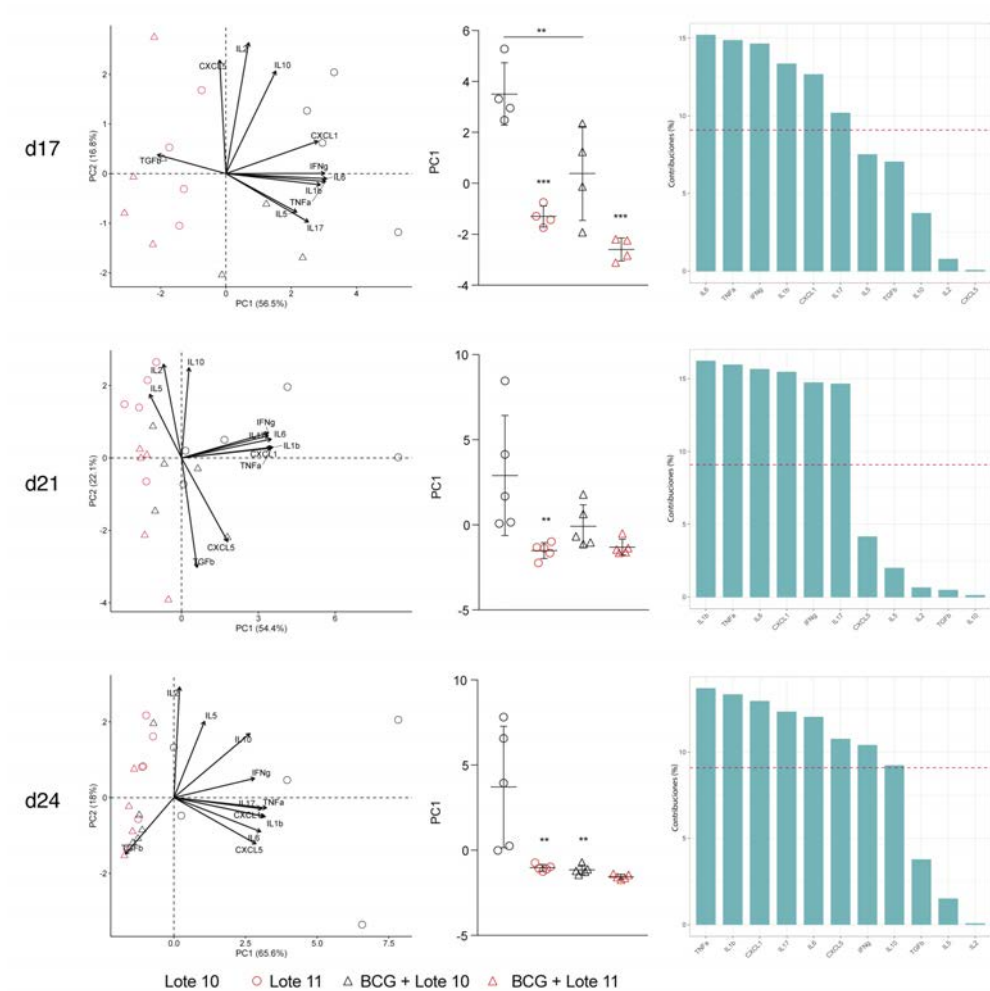
**Figura 42.** Cortes histológicos de pulmones de animales infectados con LDA e infectados vía i.v. con diferentes lotes *Mtb*. Barra de escala = 1mm



## 5.4. Análisis inmunológico

### 5.4.1. Experimento 2

Se realizó un análisis multivariado (PCA) de los mediadores inflamatorios para analizar toda la respuesta inmunológica en los diferentes grupos. Los resultados del análisis se muestran en la **Figura 43**.

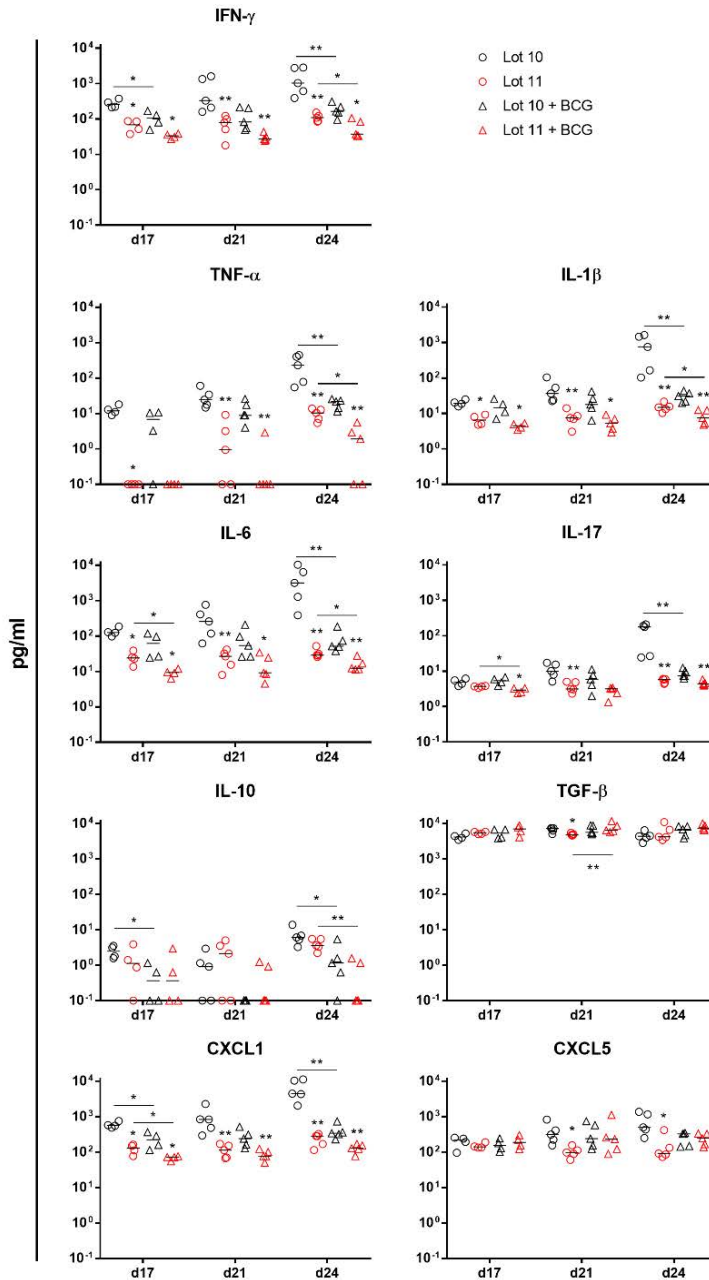


**Figura 43. Análisis multivariado del perfil inmunológico en el experimento 2.** Para cada día de eutanasia se realizó el PCA, la diferencias de PC1 entre grupos y la contribución de cada mediador inflamatorio en PC1. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; test Mann-Whitney.

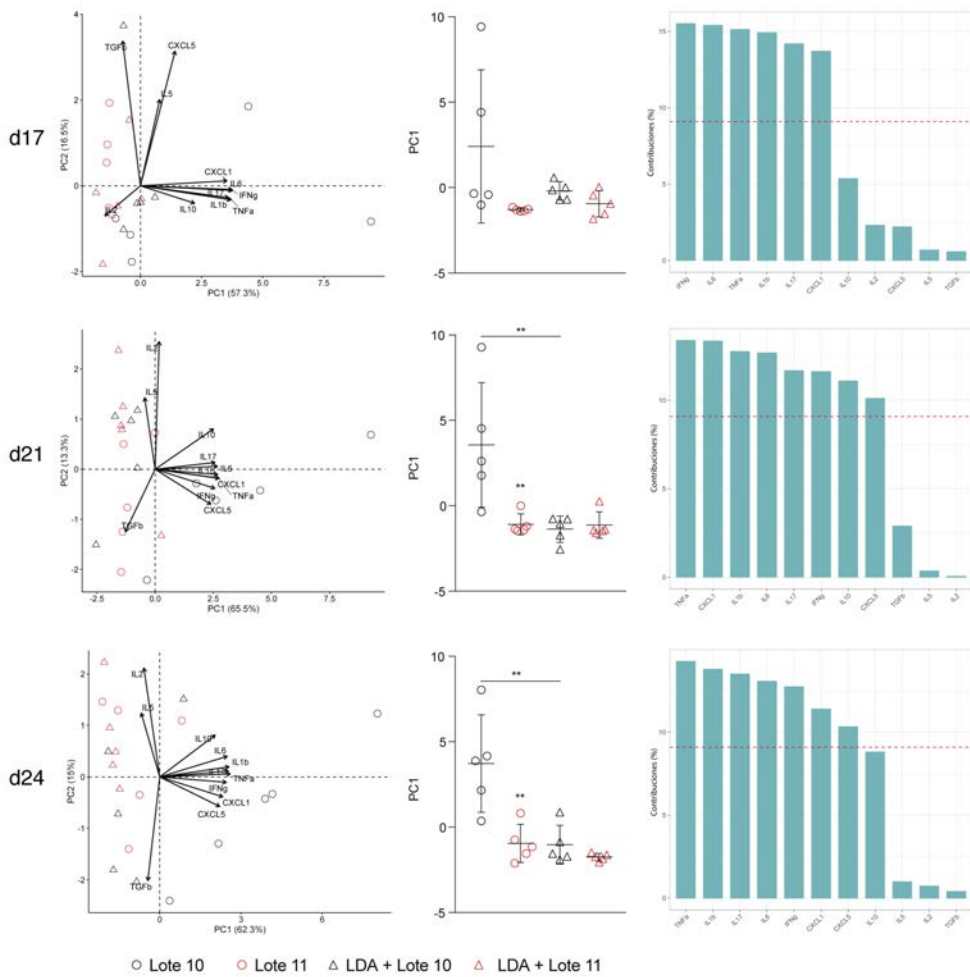
Los primeros dos componentes explican entre el 70-80% de la variación entre las muestras. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN $\gamma$ , CXCL1 y TNF $\alpha$  fueron los mediadores que contribuyeron a PC1 en todos los días de estudio. Esto se traduce en un mayor patrón proinflamatorio. Los animales del grupo lote 10 fueron los que presentaron mayores valores de PC1 en comparación al resto de grupos. Por otro lado, no se observaron diferencias de contribución en PC2 entre grupos. Los valores de cada mediador inflamatorio utilizado para realizar el PCA se encuentra representado en la **Figura 44**. Los niveles de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 y de las quimiocinas relacionadas con el reclutamiento de neutrófilos, CXCL1 y CXCL5 fueron mayores en el lote 10 comparado al lote 11. Por el contrario, las citoquinas antiinflamatorias, IL-10 y TGF $\beta$ , no mostraron estas diferencias. Este mismo resultado también se observó comparando la vacunación en ambos lotes, con la excepción de IL-10. En ambos lotes, con la vacunación se redujeron los niveles de todas la citoquinas proinflamatorias. No se detectaron prácticamente diferencias en las citoquinas antiinflamatorias, excepto para IL-10 a día 24. De las quimiocinas de reclutamiento de neutrófilos, sólo CXCL1 mostró una reducción generalizada con la vacunación.

#### 5.4.2. Experimento 3

En este experimento, los dos primeros componentes también explican entre el 70-80% de la variación entre las muestras. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN $\gamma$ , CXCL1 y TNF $\alpha$  son los mediadores que contribuyeron a PC1 todos los días analizados. IL-10 y CXCL5 también contribuyeron a día 21, y a día 24 sólo CXCL5. Los valores de PC1 no presentaron diferencias a día 17, mientras que, a día 21 y 24, el grupo lote 10 es el que presentó mayores valores de este componente. Los mediadores que contribuyeron a PC1 participan en la creación de una respuesta proinflamatoria. Por consiguiente, la infección por aerosol previa a la infección i.v. redujo el patrón proinflamatorio de una manera similar a lo que ocurre con la BCG. Para este experimento tampoco se encontraron diferencias de contribución a PC2 (**Figura 45**).

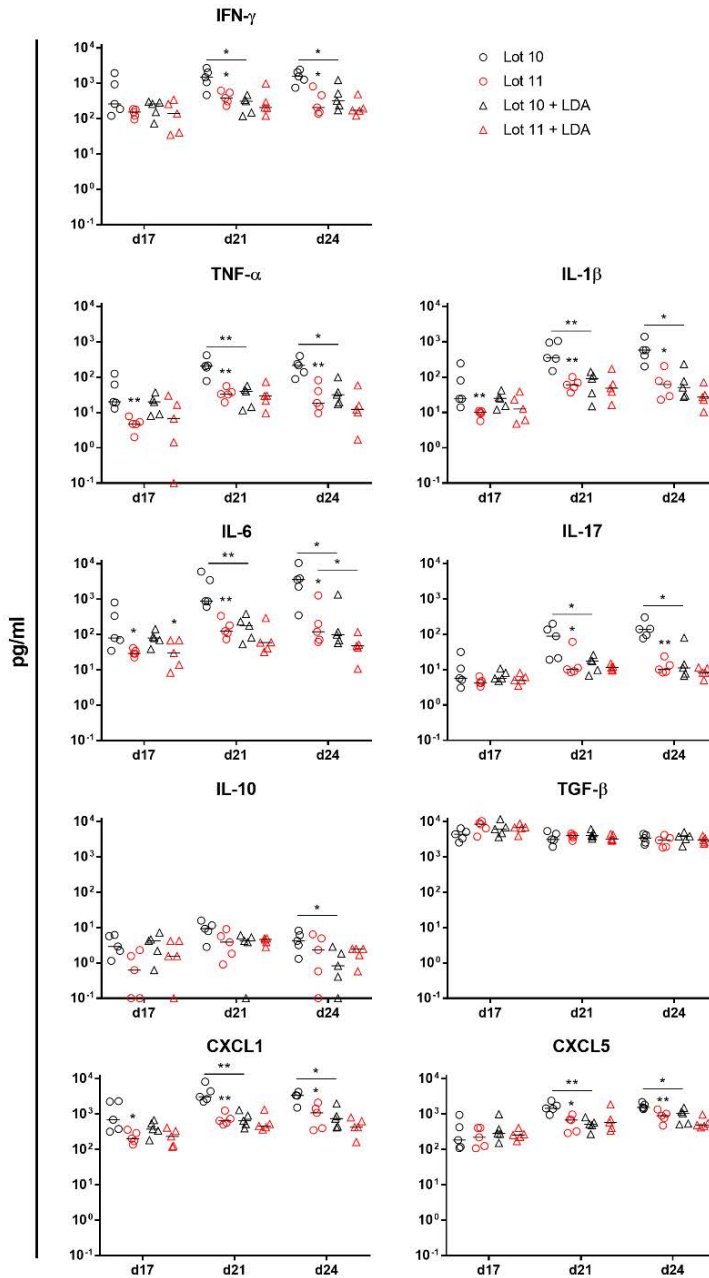


**Figura 44. Análisis de los mediadores inflamatorios en tejido pulmonar a día 17, 21 y 24 posinfección i.v.** Los resultados se presentan como el Log<sub>10</sub> de la concentración en pg/ml. Las comparaciones están indicadas de manera diferente dependiendo de la condición analizada. Los asteriscos marcan la comparación entre lotes de infección, mientras que las líneas con asteriscos marcan el efecto de la vacunación con BCG en un mismo lote. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; Test Mann-Whitney.



**Figura 45. Análisis multivariado del perfil inmunológico en el experimento 3.** Para cada día de eutanasia se realizó el PCA, la diferencias de PC1 entre grupos y la contribución de cada mediador inflamatorio en PC1. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; Test de Mann-Whitney.

Los valores de cada mediador inflamatorio utilizado para realizar el PCA se encuentran representados en la **Figura 46**. Los niveles de las citoquinas proinflamatorias y de las quimiocinas de reclutamiento mostraron una reducción con el lote 11. No se detectaron diferencias en los niveles de citoquinas antiinflamatorias entre lotes. En el grupo con infección LDA + lote 10 también se detectó una reducción de las citoquinas proinflamatorias, aunque ésta fue menor que con la BCG.



**Figura 46. Análisis de los mediadores inflamatorios en tejido pulmonar a día 17, 21 y 24 p.i. intravenosa.** Los resultados se presentan como el Log10 de la concentración en pg/ml. Las comparaciones están indicadas de manera diferente dependiendo de la condición analizada. Los asteriscos marcan la comparación entre lotes de infección mientras que las líneas con asteriscos marcan el efecto de la infección LDA en un mismo lote. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; Test de Mann-Whitney.

## 5.5. Microscopia electrónica

El análisis de las gotas de los cultivos en los dos lotes mostró que los agregados en el lote 10 eran mayores que los del lote 11. Por este motivo, se analizaron los agregados de bacteria en pulmones de ratones infectados con el lote 10 mediante microscopia electrónica. Las imágenes muestran agrupaciones de bacterias con cierto grado de organización y orientación en el espacio, descrito previamente como *cording*, formando una estructura similar a una cuerda (Figura 47).

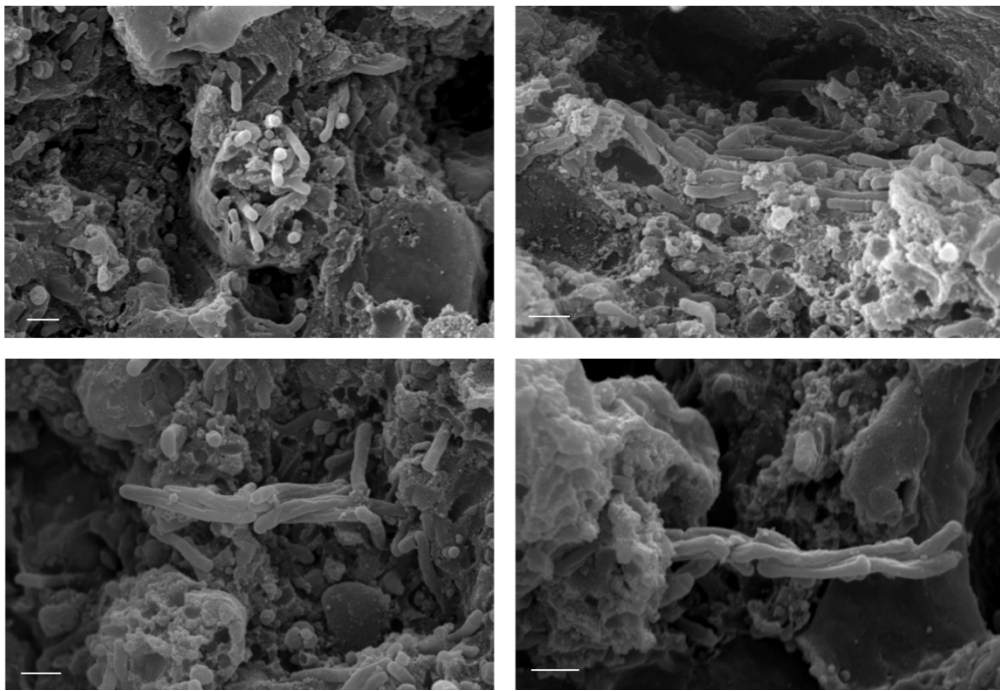


Figura 47. Micrografías obtenidas mediante SEM del *cording* en pulmón de ratón infectados con *Mtb* lote 10. Barra de escala = 1 $\mu$ m

## 6. DISCUSIÓN





La TB es un problema de salud a escala global; por este motivo, en los últimos años se han focalizado los esfuerzos en intentar frenar la epidemia que supone esta enfermedad. Para hacerlo, se intentan desarrollar nuevos modelos experimentales que reflejen las condiciones naturales en las que se da la infección y la evolución de la enfermedad. Un modelo interesante a utilizar para el estudio de la TB es el que tenga en cuenta el estudio de comorbilidades como la DM y patologías asociadas, como la obesidad.

Esta es la primera vez que se estudia la obesidad inducida por la dieta en un modelo experimental de TB. Hemos decidido evaluar la HFD como inductora de la obesidad, ya que es una dieta que se encuentra bien descrita para esta finalidad y, además, es un modelo capaz de inducir síndrome metabólico e intolerancia a la glucosa (114,115). En nuestro modelo, la dieta ha inducido incremento significativo en el peso corporal de los animales; no obstante, no se observó una hiperglucemia constante y los animales no necesitaron tratamiento con insulina. Sin embargo, esta es la situación actual de millones de ciudadanos que acabarán desarrollando diabetes (116).

Existen modelos animales en los que se induce diabetes con fármacos, como sucede con la administración de estreptozotocina. Este fármaco es incorporado por las células  $\beta$  del páncreas, productoras de insulina, induciendo fragmentación en el DNA. Estos cambios en el DNA disminuyen la capacidad de biosíntesis y secreción de la insulina. Sin embargo, este tipo de modelo se caracteriza por inducir DM1 (117,118). El tipo de DM más prevalente es la DM2, por este motivo consideramos que no es un modelo que refleje el tipo de DM que se da en la comorbilidad con TB.

Otros modelos intentan reflejar la situación actual en la que se encuentran países con una mayor prevalencia de TB, como la India o China, que, a su vez, poseen el mayor número de casos mundiales de DM. Este hecho se debe al aumento de la industrialización y la urbanización en países en desarrollo, que ha promovido el incremento de las tasas de incidencia de diabetes (67,119). Los modelos en cuestión basarían su alimentación en la denominada “dieta de cafetería”. Sin embargo, tanto

los modelos que inducen obesidad con HFD como los que la inducen con “dieta de cafetería” presentan un metabolismo disfuncional, hiperglucemia, resistencia a la insulina y alteraciones en el perfil lipídico (120,121). En este estudio queríamos evaluar los efectos de la obesidad en un estado previo al desarrollo de la diabetes, para ver si éste también puede suponer un factor de riesgo en sí mismo, pese a que se haya relacionado un alto BMI con un bajo riesgo de TB (73).

La variable de la obesidad se ha introducido en el contexto del ratón C3HeB/FeJ, una cepa que es capaz de reproducir el abanico de lesiones por TB presentes en humanos. Además, se considera la cepa de ratón que mejor refleja el paso de infección a enfermedad (22). Esta progresión difiere en la tolerancia general a la infección por *Mtb* que muestran las líneas consanguíneas, también conocidas como cepas *inbred*, las cuales solo desarrollan lesiones proliferativas. Estas lesiones se caracterizan por presentar un gran infiltrado linfocítico y no presentan un granuloma con necrosis central (23,61,122–124). La cepa C3HeB/FeJ ha sido especialmente utilizada para el estudio de la TB; en cuanto que es en un modelo animal relativamente fácil de manejar en términos de coste y facilidad de maniobrar y que presenta una patología con aspectos compartidos con los del humano. Pero, por otro lado, no existen estudios hasta la fecha en los que se evalúen el efecto de algunas comorbilidades como la DM o la obesidad.

A pesar de que no se detectaron diferencias en la BL entre dietas, la vacunación con BCG tuvo un efecto positivo sólo en ratones alimentados con ND, revelando una disminución de la capacidad protectora de la vacunación en condiciones HFD. Hasta donde sabemos, y con la excepción de algunos experimentos con infección con cepa Beijing (102), esta es la primera vez que no se ha visto efecto protector con la BCG en ratones, en términos de reducción de BL. Sin embargo, estas cepas están relacionadas con la inducción de un patrón diferente de respuesta inmunológica, después de desencadenar una respuesta de IFN de tipo I (125). Se necesitan más estudios para determinar si la HFD también induce este tipo de respuesta.

En nuestro modelo de comorbilidad, nos pareció interesante evaluar las diferencias que podrían existir entre una infección única o múltiples infecciones. Consideramos que la MCI es el tipo de infección que mejor refleja lo que ocurre en lugares donde la incidencia de TB es elevada. El interés y la importancia de este tipo de infección fue evaluado anteriormente por Cardona *et al.*, donde mostraron una reducción de la protección de la BCG con la MCI (101). Nuestros resultados muestran que la BCG no disminuye significativamente la BL en animales alimentados con HFD y, además, estas diferencias son aún menores en situación de MCI.

El análisis de la histometría, 3 semanas después de la SI, mostró una reacción inusual para el grupo HFD, ya que estos ratones mostraron una respuesta más fuerte después de la vacunación con BCG que la de los animales no vacunados, a diferencia de lo que ocurrió con los ND. Esta respuesta no se mantuvo en la fase crónica de la infección, mostrando lo que parece ser una respuesta inmunológica retardada. Por otro lado, en los ratones infectados con MCI, tanto vacunados como no vacunados, se observó una mayor infiltración en todas las semanas de estudio. Esta reacción diferente observada en HFD se puede relacionar con la disfunción de la respuesta inmunológica contra la TB vinculada a la obesidad y la diabetes. Pese a todo, este aumento crónico en la respuesta proinflamatoria no da como resultado el fenotipo histológico esperado, en términos de aumentar el número de lesiones exudativas. Esto va en concordancia con la intensidad del riesgo observado en presencia de diabetes (alrededor de 3 veces más) (70), que es más bajo que el riesgo observado en condiciones de inmunosupresión como el que se da con terapia anti-TNF o SIDA. En el caso de terapias biológicas,° éstas presentan riesgo superior de entre un 1,5-17, mientras que en la población infectada con VIH, el riesgo llega a ser de hasta 100 veces mayor (126). En estos casos se puede observar un fenotipo claro en el que se muestran amplias zonas necróticas, debido en ambos casos a una deficiencia en TNF (25,127).

Según lo descrito por varios autores, la infección por aerosol puede inducir dos tipos de lesiones en este modelo: las lesiones proliferativas, caracterizadas por una lenta

progresión y una propagación a través de macrófagos espumosos infectados, y las lesiones exudativas, en las que los neutrófilos se acumulan en la periferia promoviendo el crecimiento bacilar extracelular que finalmente resulta en una necrosis central a gran escala (6,62,66,128). Sorprendentemente, el análisis del tipo de lesiones reveló regiones exudativas más grandes en animales infectados con SI que en los infectados con MCI. Las lesiones exudativas están relacionadas con una mayor BL, por lo que se esperaría encontrar este tipo de lesiones en los ratones que recibieron un mayor número de infecciones (35). Para explicar este fenómeno se necesitan más estudios al respecto.

El perfil de citoquinas pulmonares analizado a semana 4 mostró que, para los animales infectados con SI, hay un mayor perfil proinflamatorio en animales alimentados con ND en comparación a los animales HFD, independientemente del estado de vacunación. Esto confirma que existe un retraso y/o disfunción en el inicio de la respuesta inmunológica en animales HFD, como hemos visto en el análisis histometría. En cambio, este patrón se ve revertido cuando los animales son infectados con MCI, los cuales reciben recuentos bacilares más elevados. Esta fuerte respuesta proinflamatoria en ratones HFD no tiene ninguna ventaja en términos de reducción de BL. Además, refleja un entorno proinflamatorio basal más alto. Este hecho también puede explicar los resultados observados en la patología.

A nivel de microbiota intestinal, y según datos recientes, el modelo es más complejo de lo esperado. Dalby *et al.* han demostrado que las dietas refinadas reducen la diversidad de la microbiota intestinal y aumentan la ratio F/B, independientemente de la grasa en la dieta. En su estudio demostraron que una dieta refinada baja en grasas también es capaz de inducir disbiosis, sin relación con la obesidad o la hiperglucemia (129). Además, una ratio F/B elevada favorece la intolerancia a la glucosa, y esto se encuentra relacionado con una respuesta inmunológica deteriorada (115). En consecuencia, tenemos dos factores independientes que pueden explicar la mayor progresión hacia TB. En primer lugar, el síndrome metabólico y la obesidad,

ambos relacionados con la diabetes. Estos factores están claramente vinculados a una disfuncionalidad de la inmunidad, mientras que estudios relacionados con la enfermedad de Chagas muestran que una alimentación con HFD reduce la letalidad de los ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* en un 35% (130). En segundo lugar, la disbiosis y el aumento de la ratio F/B que han sido relacionados con una disminución de la resistencia a la enfermedad en un estudio que compara ratones salvajes con ratones de laboratorio (131). Por otro lado, se ha demostrado que la infección por *Mtb* reduce la diversidad de la microbiota intestinal (93,96). Nuestros resultados muestran que la HFD agrava esta tendencia, y además también se observa una menor supervivencia en los animales alimentados con esta dieta.

Resultados de Rosshart *et al.*, muestran que la microbiota natural favorece la adaptación, y limita la respuesta inflamatoria sistémica y local frente a diversas enfermedades aumentando la supervivencia de los animales (131). En nuestro caso, esta microbiota presentaría más similitudes con la de los animales alimentados con ND. No obstante, se requieren más estudios que incluyan ratones alimentados con dietas refinadas bajas en grasas (129). Este es un tema importante dado el reciente artículo de Maji *et al.*, en el que encontraron una mayor diversidad de la microbiota intestinal en pacientes con TB, incluso después de 1 mes de tratamiento antibiótico, en comparación con los controles, dando a lugar a una mayor presencia de SCFA. Estos y otros autores sostienen que estos productos, especialmente el butirato, tienen un fuerte efecto antiinflamatorio estimulando las células Treg del intestino, que a su vez producen IL-10, facilitando la infección crónica (81,132).

En nuestro modelo, la HFD causó disbiosis de la microbiota intestinal, induciendo así un ambiente proinflamatorio, limitando la diversidad del bacterioma y causando un aumento en la ratio F/B. Estos son los filos más importantes en humanos. Se ha descrito que el filo Bacteroidetes se reduce con la obesidad y posteriormente se restaura al perder peso con dieta (100). La pregunta que surge es cómo la disbiosis puede estar influyendo en la progresión de la TB. Un estudio reciente vincula una alta

diversidad y una ratio F/B baja con una mayor adaptación del huésped y supervivencia en enfermedades como en la infección pulmonar con el virus influenza A y la carcinogénesis colorrectal. Este hecho es coherente con nuestros resultados, los cuales apuntan hacia una especie de “efecto neutral” causado por la abundancia de la familia Porphyromonadaceae, específicamente *Barnesiella*, encontrada en condiciones ND (131).

El análisis de la microbiota mostró diferencias con resultados previos obtenidos en ratones alimentados con HFD. Estas diferencias se encuentran relacionadas, probablemente, tanto con la infección con *Mtb* como con el tiempo de alimentación. En nuestro caso, el análisis fue realizado después de 16 y 28 semanas del inicio de la dieta, que resulta bastante más tiempo que las 8 y 10 semanas reportadas previamente (115,129).

En relación al filo Firmicutes, los ratones alimentados con ND presentaron niveles más bajos de la familia Ruminococcaceae, la cual se encuentra relacionada con la producción de SCFA (133), desencadenando una respuesta antiinflamatoria. Es interesante remarcar que el epítipo expresado en la flagelina de la familia Lachnospiraceae, la cual resulta la familia más importante del filo Firmicutes en ambas dietas, es un potente inductor de Treg gracias a la producción de TGF $\beta$  por CD de ratón (134,135). Por otro lado, un estudio muestra un aumento significativo de Lachnospiraceae en ratones bajo estrés, que causó un aumento de corticoides a nivel sistémico y de los niveles IFN $\gamma$  e IL-17, así como de lesiones en la mucosa (136). Estos resultados son coherentes con el estrés que se induce con la infección por TB, independientemente de la dieta.

A nivel de género, y aunque solo representaron un reducido porcentaje de la microbiota global, los animales alimentados con HFD presentaron un aumento de los *clusters* IV y XIVa del género *Clostridium*. Éstos favorecen la acumulación de células Treg en el colon (90), aunque no se traduce en una mayor cantidad de IL-10 a nivel pulmonar. De la misma manera, los géneros *Anaerotruncus* y *Acetatifactor*, con

un papel proinflamatorio, han sido relacionados con la progresión de la artritis en ratones. En nuestro estudio, se observaron niveles elevados en ratones alimentados con HFD, sugiriendo por tanto, una respuesta proinflamatoria (137). Curiosamente, se detectó una ausencia total de la familia Lactobacillaceae en ratones C3HeB/FeJ. Este es un factor importante, ya que en relación a los resultados publicados por Winglee *et al.*, esta es la familia predominante (alrededor de un 50% de abundancia relativa) en ratones C57BL/6 infectados con *Mtb* (96). En contraposición, datos recientes del estudio de Namasyvayam *et al.*, en ratones C57BL/6J-CD45a(Ly5a) infectados con *Mtb*, mostraron esta familia pero en con una abundancia relativa bastante menor (alrededor de un 3%) (93). Este factor puede resultar importante y crítico del microbioma de los ratones C3HeB/FeJ, ya que puede determinar el desencadenamiento de la fuerte respuesta inflamatoria que causa el desarrollo de las lesiones exudativas. Además, la familia Lactobacillaceae también ha sido relacionada con la disminución de la respuesta inflamatoria y, por consiguiente, el equilibrio inmunológico, aunque se encuentra reportado en el contexto de la enfermedad inflamatoria intestinal (133).

Las diferencias más notables causadas por la dieta fueron encontradas en el filo Bacteroidetes, con una reducción de *Barnesiella* y un incremento de *Alistipes* con el tiempo en animales HFD. Estos cambios pueden ser cruciales en las diferencias de evolución experimentadas por ambos grupos. La familia más abundante en ambos tipos de dieta es Porphyromonadaceae, la cual se encuentra disminuida en HFD. Esta familia se encuentra aumentada en animales alimentados con dieta alta en proteínas/baja en carbohidratos (138) y reducida en animales alimentados con ácidos grasos poliinsaturados omega 6 (137). Esto ha sido también relacionado con la disbiosis observada en pacientes con espondilitis anquilosante, una artropatía hereditaria relacionada con la inmunidad (139). El género *Barnesiella*, además, ha demostrado ser útil para reducir la colonización de *Enterococcus* de una “forma neutral”, ya que no se cree que esté asociado al desarrollo inmunológico o enfermedades inflamatorias del intestino (140). Por el contrario, *Alistipes* es el género

más sobrerrepresentado relacionado con la fragilidad en los ancianos (141), y también se encuentra aumentada en HFD (142). En general, parece que la colonización con la familia Porphyromonadaceae, y en particular con el género *Barnesiella*, puede tener un impacto positivo en la reducción del medio proinflamatorio del intestino.

En relación a la Proteobacteria, la HFD produjo un aumento sostenido en el género *Parasutterella*, lo cual es contrario a lo encontrado en la cepa C57BL/6 (142). Otros estudios han asociado el aumento de este género con disbiosis en el intestino, en submucosa individuos con enfermedad de Crohn (143), y en ratas con hipertrigliceridemia relacionada con pancreatitis aguda necrotizante (144).

Finalmente, los ratones alimentados con HFD presentaron una mayor abundancia relativa de los géneros *Mucispirillum* y *Akkermansia*. A diferencia de la mayoría de las bacterias comensales, estos dos géneros evaden la IgA independiente de T y provocan una respuesta dependiente de T (145). En contraste con nuestros resultados, la abundancia de *Akkermansia muciniphila* se ha visto reducida en condiciones de obesidad y de diabetes, y su administración puede contrarrestar el desarrollo de obesidad inducida por HFD y la disfunción de la barrera intestinal (146). Se ha descrito que *Mucispirillum schaedleri* se encuentra elevado en inflamación intestinal en modelos murinos, y además está asociada a la mucosidad adaptada al estrés oxidativo que ocurre durante la inflamación (147).

En relación con la NI se encontró que ésta aumenta la supervivencia en animales alimentados con HFD en comparación a lo que se observó con la vacunación con BCG. Estos resultados se pueden relacionar con el tipo de inmunidad que se crea cuando hay una infección previa de *Mtb* y la protección que esto genera. Además, abre una ventana a la mejora y la evaluación en este modelo de nuevas estrategias profilácticas contra la TB.

Para inducir la NI experimentalmente se utilizó un tratamiento antibiótico después de la infección por aerosol. Este procedimiento ya había sido descrito previamente



por otros autores (148–150). El impacto del tratamiento antibiótico fue mayor para la microbiota intestinal de los ratones alimentados con ND. Esto podría explicar por qué la NI fue menos efectiva en este grupo de estudio. Estos animales mostraron una reducción drástica de la ratio F/B. Esto se explica por la reducción observada en la familia Lachnospiraceae para el filo Firmicutes, y el aumento de Porphyromonadaceae para el filo Bacteroidetes; lo cual aumentaría el “efecto neutral” de la microbiota. El tratamiento antibiótico promovió la presencia del género *Akkermansia* en los ND, aumentando así la estimulación de células T. Teniendo en cuenta estos resultados, se podría hipotetizar que la inducción de un efecto protector por la infección natural podría requerir un cierto efecto antiinflamatorio. Esto es coherente con datos recientes que sugieren que un exceso de estimulación de células T efectoras puede ser perjudicial para una respuesta inmunológica protectora (151,152). Por el contrario, la quimioterapia en ratones alimentados con HFD no tiene impacto en la abundancia de Firmicutes. En este grupo, el aumento de diversos *Clostridium* parece “compensar” la pérdida de Ruminococcaceae y Lachnospiraceae. Tampoco se observó una gran influencia en la abundancia de Bacteroidetes, y se detectó un aumento de la presencia de Enterobacteriaceae, lo cual es difícil de analizar ya que no afectó a los niveles de *Akkermansia*.

No sólo es importante el estudio de los factores ambientales y del huésped en el desarrollo y progresión de TB sino que también se deben incluir estudios que tengan en cuenta las diferencias en la virulencia del patógeno. En el estudio II se demuestra que dos lotes de una misma cepa de *Mtb* H37Rv presentan diferente patogenicidad. Las diferencias observadas entre los dos lotes se deben a diferencias en la morfología de la bacteria que presentan ambos lotes. Estas diferencias recaen en el hecho de que las bacterias del lote 10 se organizan formando más agregados que las del lote 11. El análisis de la bacteria del lote 10 en pulmones de ratones infectados muestra que estas se organizan formando cuerdas. El fenómeno del *cording* ya se ha demostrado extensamente que influye en la virulencia de la bacteria y disminuye la supervivencia

en ratones infectados con cepas con diferencias en la capacidad de formar cuerdas (106).

Inicialmente la capacidad en la formación de *cording* se relacionó con un glicolípido de la pared, el TDM. Se determinó que este glicolípido era exclusivo de *Mtb* y fue nombrado como *cord factor* (108). Más adelante el TDM fue descrito en otras especies de *Mycobacterium* diferentes a *Mtb* (109) y se ha demostrado que la mutación de distintos genes implicados en la formación de la envoltura de la pared de las micobacterias puede llevar a la pérdida de *cording* (10,106,111,153).

Sin embargo, el estudio llevado a cabo por Cáceres *et al.* mostró diferentes características morfológicas en las bacterias según el estado de crecimiento en el que se encuentre, si en fase exponencial o en fase estacionaria (112). Las bacterias de los dos lotes utilizados han crecido en el mismo medio líquido pero con una diferencia de 2 días entre un lote y otro. Por tanto, el aumento del tiempo de crecimiento (+2 días) en el lote 10 implica un aumento de la virulencia de la bacteria y una mayor agregación de ésta.

La respuesta inmunológica de ambos lotes también presenta variaciones. Los animales infectados con el lote con capacidad de hacer *cording*, presentan un patrón proinflamatorio marcadamente elevado. No constan estudios en los que se evalúe el perfil inmunológico en este sentido, pero hay estudios que confirman la capacidad inmunomoduladora de los ácidos micólicos de la pared bacteriana y de la ciclopropanación de éstos (154). Los ácidos micólicos participan en la formación del *cording* (111), por lo cual sería interesante realizar estudios para ver si existen diferencias en la pared bacteriana de ambos lotes dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentren.

En paralelo a la evaluación de las diferentes capacidades patogénicas de ambos lotes, se ha evaluado la capacidad de protección conferida por la BCG o la infección LDA. Ya había sido descrito, por Mollenkopf *et al.*, que la infección con *Mtb* confiere una protección similar a la que se da por la BCG, pero no se sabe si los mecanismos que

confieren esta protección son los mismos (51). En nuestro estudio el perfil proinflamatorio tanto en vacunación como en infección primaria se ven reducidos en comparación al control. Este resultado es observado sobre todo en el lote 10 en parte porque la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección con este lote ya es más elevada de por sí. El motivo de que esto sea así es porque es posible que se esté inoculando más bacilos con el lote 10 pese a que se obtenga un recuento de CFU similar para ambos lotes. Como muestran los resultados, la bacteria en lote 10 se organiza formando más agregados. Éstos serían disgregados, en parte, por la inoculación de la bacteria vía i.v. con una aguja de bajo calibre. Pese a esto sería posible la inoculación de la bacteria formando pequeños agregados y, en consecuencia, desencadenando una mayor respuesta inflamatoria.

Extrapolando estos resultados al campo de desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas, futuras investigaciones deben seguir analizando qué tipo de respuesta desencadena la infección por *Mtb* en aquellos individuos infectados y que no desarrollan la enfermedad y qué diferencias existen con la respuesta inmunológica debida a la vacunación con BCG. Este tipo de aproximación podría llevarse a cabo mediante experimentos como los presentados en el estudio II y analizar a lo largo de los días diferencias en el perfil de citocinas de los ratones bajo las dos “estrategias terapéuticas”. Finalmente, las diferencias en el *cording* de dos lotes de una misma cepa de *Mtb* es un tema muy importante por diversos motivos. En primer lugar, en el ámbito de la reproducibilidad de experimentos y la evaluación de nuevos candidatos en modelos animales, donde hay que tener en cuenta la cantidad de bacteria que se está inoculando, ya que ésta tiende a agregarse. En segundo lugar, tener en cuenta que existen diversas vacunas basadas en microorganismos completos (47), y viendo los resultados del estudio II, pueden existir diferencias entre lotes de una misma vacuna y esto afectar al resultado esperado.

Recapitulando, la obesidad establecida con una HFD es capaz de inducir un estado de prediabetes. Ésta es la situación en la que se encuentran millones de personas en

países con una prevalencia de TB elevada. Si bien es sabido que la DM actúa como un factor de riesgo para el desarrollo de la TB, no existen modelos animales que mimeticen esta comorbilidad. Con nuestro estudio hemos desarrollado un modelo animal de comorbilidad de TB y obesidad en el que se ha observado una hiperglucemia en ratones alimentados con HFD. En ellos se ha visto una reducción de la protección de la BCG, la única vacuna disponible contra la TB, no descrita anteriormente en otros estudios en modelos animales. Esta vacuna presenta una protección variable en formas adultas de TB pulmonar, por este motivo, este modelo ofrece al campo de investigación de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas una ventana a la mejora y donde evaluar nuevos candidatos a vacuna. En este modelo también se ha observado una disminución de la microbiota intestinal a causa de la dieta que puede estar influyendo en la eficacia de la vacuna. Además, se ha analizado el *cording* como factor que afecta a la patogenicidad de la bacteria. En estos experimentos hemos observado que tanto la vacunación con BCG como la infección LDA previas a una infección i.v. ofrecen una protección muy similar. Estos resultados se dirigen hacia la investigación de vacunas que ofrezcan una respuesta inmunológica similar a la que produce *Mtb* y a evaluar las diferencias a causa de la agregación de las bacterias tanto en stocks para infección en modelos animales como en vacunas basadas en microorganismos completos.

## 7. CONCLUSIONES



- 1- Se ha establecido un modelo de comorbilidad de TB y obesidad inducida mediante una dieta alta en grasas útil para evaluar nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas.
- 2- La vacunación con BCG presenta una protección variable en el modelo de comorbilidad y demuestran que el modelo es útil para la evaluación de vacunas contra la TB.
- 3- La infección vía aerosol del tipo MCI se establece como el método de infección de elección por ser el que mejor representa la infección natural por *Mtb* en humanos.
- 4- El estudio de la microbiota intestinal, en este modelo y con este tipo de comorbilidad, puede ayudar a entender diferencias en la respuesta a TB.
- 5- Diferentes subcultivos de una misma cepa pueden adquirir diferente capacidad de hacer *cording*. Este hecho afecta a la virulencia de la bacteria y puede dar a lugar a diferentes resultados en un mismo diseño experimental i puede influir negativamente a la hora de desarrollo preclínico de vacunas basadas en cepas de organismos.





## 8. REFERENCIAS



1. Koch R. The Etiology of Tuberculosis. *Am J Med Sci.* 1882;84(167):243–4.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report [Internet]. 2018. Available from: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
3. Center for Disease Control and Prevention. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis [Internet]. 2013. p. 19–43. Available from: [https://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/corecurr\\_all.pdf](https://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/corecurr_all.pdf)
4. Ates Guler S, Bozkus F, Inci MF, Kokoglu OF, Ucmak H, Ozden S, et al. Evaluation of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in immunocompetent adults: A retrospective case series analysis. *Med Princ Pract.* 2015;24(1):75–9.
5. Musellim B, Erturan S, Duman ES, Ongen G. Comparison of extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis cases: Factors influencing the site of reactivation. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9(11):1220–3.
6. Lin JN, Lai CH, Chen YH, Lee SSJ, Tsai SS, Huang CK, et al. Risk factors for extra-pulmonary tuberculosis compared to pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13(5):620–5.
7. Tang J, Yam WC, Chen Z. Mycobacterium tuberculosis infection and vaccine development. *Tuberculosis.* 2016;98:30–41.
8. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, Fordham von Reyn C. Tuberculosis. *N Engl J Med.* 2013 Feb 21;368(8):745–55.
9. O’Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The Immune Response in Tuberculosis. Vol. 31, *Annual Review of Immunology.* 2013. 475–527 p.
10. Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol.* 2007;27(4):347–62.
11. Lenaerts A, Barry CE, Dartois V. Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses. *Immunol Rev.* 2015 Mar 1;264(1):288–307.
12. Ai J-W, Ruan Q-L, Liu Q-H, Zhang W-H. Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerg Microbes Infect.* 2016 Jan 25;5(1):1–8.
13. Bansal R, Sharma D, Singh R. Tuberculosis and its Treatment: An Overview. *Mini-Reviews Med Chem.* 2016;18(1):58–71.
14. Munro SA, Lewin SA, Smith HJ, Engel ME, Fretheim A, Volmink J. Patient Adherence to Tuberculosis Treatment: A Systematic Review of Qualitative

- Research. Rylko-Bauer B, editor. PLoS Med. 2007 Jul 24;4(7):e238.
15. Gebreweld FH, Kifle MM, Gebremicheal FE, Simel LL, Gezae MM, Ghebreyesus SS, et al. Factors influencing adherence to tuberculosis treatment in Asmara, Eritrea: a qualitative study. *J Heal Popul Nutr.* 2018 Dec 5;37(1):1.
  16. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines [Internet]. Vol. 16. 2010. Available from: <https://www.who.int/tb/publications/2010/9789241547833/en/>
  17. Li D, He W, Chen B, Lv P. Primary multidrug-resistant tuberculosis versus drug-sensitive tuberculosis in non-HIV-infected patients: Comparisons of CT findings. Hozbor DF, editor. PLoS One. 2017 Jun 6;12(6):e0176354.
  18. Mathuria JP, Samaria JK, Srivastava GN, Mathuria BL, Ojha SK, Anupurba S. Primary and acquired drug resistance patterns of Mycobacterium tuberculosis isolates in India: A multicenter study. *J Infect Public Health.* 2013 Dec 1;6(6):456–64.
  19. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, Marais B, Mchugh TD, Ford N, et al. Tuberculosis Diagnostics and Biomarkers: Needs, Challenges, Recent Advances, and Opportunities. *J Infect Dis.* 2012 May 15;205(suppl\_2):S147–58.
  20. Schito M, Migliori GB, Fletcher HA, McNerney R, Centis R, D’Ambrosio L, et al. Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines. *Clin Infect Dis.* 2015 Oct 15;61(suppl 3):S102–18.
  21. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Van Crevel R. Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol Res.* 2011 Apr 7;2011.
  22. Marzo E, Vilaplana C, Tapia G, Diaz J, Garcia V, Cardona P-J. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis.* 2014;94(1):55–64.
  23. Kramnik I, Beamer G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. *Semin Immunopathol.* 2016;38(2):221–37.
  24. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet.* 2003 Sep 13;362(9387):887–99.
  25. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3504–11.

26. Colombo MI, Gutierrez MG, Romano PS. The two faces of autophagy: Coxiella and Mycobacterium. *Autophagy*. 2006;2(3):162–4.
27. Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine Activation Leads to Acidification and Increases Maturation of Mycobacterium avium-Containing Phagosomes in Murine Macrophages. *J Immunol*. 1998 Feb 1;160(3):1290–6.
28. Cardona P-J. Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018 Jan;36(1):38–46.
29. Russell DG, Cardona P-J, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol*. 2009;10(9):943–8.
30. Blomgran R, Ernst JD. Lung Neutrophils Facilitate Activation of Naive Antigen-Specific CD4 + T Cells during Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Immunol*. 2011;186(12):7110–9.
31. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, et al. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med*. 2006;203(7):1805–15.
32. Orme IM. Tuberculosis vaccine types and timings. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(3):249–57.
33. Orme IM, Basaraba RJ. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Semin Immunol*. 2014 Dec 1;26(6):601–9.
34. Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G. Macrophages in tuberculosis: Friend or foe. *Semin Immunopathol*. 2013;35(5):563–83.
35. Cardona P-J. The key role of exudative lesions and their encapsulation: Lessons learned from the pathology of human pulmonary tuberculosis. *Front Microbiol*. 2015;6:1–8.
36. Ndlovu H, Marakalala MJ. Granulomas and inflammation: Host-directed therapies for tuberculosis. *Front Immunol*. 2016;7:434.
37. Silva Miranda M, Breiman A, Allain S, Deknuydt F, Altare F. The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria? *Clin Dev Immunol*. 2012 Jul 3;2012:1–14.
38. Zumla A, Rao M, Parida SK, Keshavjee S, Cassell G, Wallis R, et al. Inflammation and tuberculosis: Host-directed therapies. *J Intern Med*. 2015;277(4):373–87.
39. Hawn TR, Matheson AI, Maley SN, Vandal O. Host-Directed Therapeutics

- for Tuberculosis: Can We Harness the Host? *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(4):608–27.
40. Lahey T, von Reyn CF. *Mycobacterium bovis* BCG and New Vaccines for the Prevention of Tuberculosis. In: *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections, Seventh Edition.* American Society of Microbiology; 2016. p. 187–209.
  41. Zenteno-Cuevas R. Successes and failures in human tuberculosis vaccine development. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(12):1481–91.
  42. Kaufmann SHE, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis.* 2017;56:263–7.
  43. Behr MA. BCG — different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis.* 2002 Feb;2(2):86–92.
  44. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PEM, et al. Protection by BCG Vaccine Against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Clin Infect Dis.* 2014 Feb 15;58(4):470–80.
  45. Smith CM, Proulx MK, Olive AJ, Laddy D, Mishra BB, Moss C, et al. Tuberculosis Susceptibility and Vaccine Protection Are Independently Controlled by Host Genotype. *MBio.* 2016 Nov 20;7(5):e01516-16.
  46. Frick M. TB prevention pipeline report 2018 [Internet]. 2018. Available from: [http://pipelinereport.org/sites/default/files/pipeline\\_2018\\_tb\\_prevent\\_mf\\_web2.pdf](http://pipelinereport.org/sites/default/files/pipeline_2018_tb_prevent_mf_web2.pdf)
  47. Andersen P, Scriba TJ. Moving tuberculosis vaccines from theory to practice. *Nat Rev Immunol.* 2019;
  48. Ziegler JE, Edwards ML, Smith DW. Exogenous reinfection in experimental airborne tuberculosis. *Tubercle.* 1985 Jun;66(2):121–8.
  49. Cadena AM, Hopkins FF, Maiello P, Carey AF, Wong EA, Martin CJ, et al. Concurrent infection with *Mycobacterium tuberculosis* confers robust protection against secondary infection in macaques. *PLoS Pathog.* 2018;14(10):1–17.
  50. Jung Y-J, Ryan L, LaCourse R, North RJ. Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Exp Med.* 2005 Jun 20;201(12):1915–24.
  51. Mollenkopf H, Kursar M, Kaufmann SHE. Immune Response to Postprimary Tuberculosis in Mice: *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin Induce Equal Protection. *J Infect Dis.*

- 2004;190(3):588–97.
52. Zhan L, Tang J, Sun M, Qin C. Animal Models for Tuberculosis in Translational and Precision Medicine. *Front Microbiol.* 2017 May 4;8:717.
  53. Cardona P-J, Williams A. Experimental animal modelling for TB vaccine development. *Int J Infect Dis.* 2017;56:268–73.
  54. Medina E, North RJ. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and *Nramp1* genotype. *Immunology.* 1998 Dec 25;93(2):270–4.
  55. Guirado E, Gil O, Cáceres N, Singh M, Vilaplana C, Cardona P-J. Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(8):1229–37.
  56. Singh AK, Gupta UD. Animal models of tuberculosis: Lesson learnt. *Indian J Med Res.* 2018;147(5):456.
  57. Williams A, Hall Y, Orme IM. Evaluation of new vaccines for tuberculosis in the guinea pig model. *Tuberculosis.* 2009;89(6):389–97.
  58. Fonseca KL, Rodrigues PNS, Olsson IAS, Saraiva M. Experimental study of tuberculosis: From animal models to complex cell systems and organoids. *PLoS Pathog.* 2017;13(8):1–13.
  59. Peña JC, Ho W. Non-Human Primate Models of Tuberculosis. *Tuberc Tuberc Bacillus*, Second Ed. 2016;163–76.
  60. Scanga CA, Flynn JL. Modeling tuberculosis in nonhuman primates. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(12):1–16.
  61. Gil O, Díaz I, Vilaplana C, Tapia G, Díaz J, Fort M, et al. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS One.* 2010;5(4).
  62. Irwin SM, Driver E, Lyon E, Schrupp C, Ryan G, Gonzalez-Juarrero M, et al. Presence of multiple lesion types with vastly different microenvironments in C3HeB/FeJ mice following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Dis Model Mech.* 2015 Jun 1;8(6):591–602.
  63. Orme IM. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis.* 2003;83(1–3):112–5.
  64. Driver ER, Ryan GJ, Hoff DR, Irwin SM, Basaraba RJ, Kramnik I, et al. Evaluation of a mouse model of necrotic granuloma formation using

- C3HeB/FeJ mice for testing of drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(6):3181–95.
65. Prats C, Vilaplana C, Valls J, Marzo E, Cardona P-J, López D. Local Inflammation, Dissemination and Coalescence of Lesions Are Key for the Progression toward Active Tuberculosis: The Bubble Model. *Front Microbiol.* 2016 Feb 2;7:33.
  66. Cardona P, Cardona P-J. Regulatory T Cells in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front Immunol.* 2019 Sep 11;10:2139.
  67. Bates M, Marais BJ, Zumla A. Tuberculosis Comorbidity with Communicable and Noncommunicable Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Nov 1;5(11):a017889.
  68. Harries AD, Lin Y, Satyanarayana S, Lönnroth K, Li L, Wilson N, et al. The looming epidemic of diabetes-associated tuberculosis: learning lessons from HIV-associated tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011 Nov 1;15(11):1436–45.
  69. Dooley KE, Chaisson RE. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *Lancet Infect Dis.* 2009 Dec 1;9(12):737–46.
  70. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med.* 2008;5(7):1091–101.
  71. Cegielski JP, Arab L, Cornoni-Huntley J. Nutritional risk factors for tuberculosis among adults in the United States, 1971–1992. *Am J Epidemiol.* 2012;176(5):409–22.
  72. Leung CC, Lam TH, Chan WM, Yew WW, Ho KS, Leung G, et al. Lower Risk of Tuberculosis in Obesity. *Arch Intern Med.* 2007 Jun 25;167(12):1297.
  73. Lönnroth K, Williams BG, Cegielski P, Dye C. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. *Int J Epidemiol.* 2010;39(1):149–55.
  74. Roth J, Sahota N, Patel P, Mehdi SF, Wiese MM, Mahboob HB, et al. Obesity Paradox, Obesity Orthodox, and the Metabolic Syndrome: An Approach to Unity. *Mol Med.* 2016;22(1):873–85.
  75. Golay A, Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19(4):649–63.
  76. Kim SJ, Ye S, Ha E, Chun EM. Association of body mass index with incident tuberculosis in Korea. Bach H, editor. *PLoS One.* 2018 Apr 18;13(4):e0195104.
  77. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of



- human metabolism. *Nature*. 2016;535(7610):56–64.
78. Martens GW, Arikian MC, Lee J, Ren F, Greiner D, Kornfeld H. Tuberculosis susceptibility of diabetic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(5):518–24.
  79. Vallerskog T, Martens GW, Kornfeld H. Diabetic Mice Display a Delayed Adaptive Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2010;184(11):6275–82.
  80. Podell BK, Ackart DF, Obregon-Henao A, Eck SP, Henao-Tamayo M, Richardson M, et al. Increased severity of tuberculosis in guinea pigs with type 2 diabetes: A model of diabetes-tuberculosis comorbidity. *Am J Pathol*. 2014;184(4):1104–18.
  81. Lazar V, Ditu L-M, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, et al. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front Immunol*. 2018 Aug 15;9:1830.
  82. Neish AS. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):65–80.
  83. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59–65.
  84. Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids Health Dis*. 2016;15(1):1–8.
  85. Lynch S V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2369–79.
  86. Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*. 2012;4(8):1095–119.
  87. Samuelson DR, Welsh DA, Shellito JE. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Front Microbiol*. 2015 Oct 7;6:1085.
  88. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(SUPPL. 1):4615–22.
  89. Mazmanian SK, Cui HL, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005;122(1):107–18.
  90. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al.

- Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science* (80- ). 2011 Jan 21;331(6015):337–41.
91. Meijer K, De Vos P, Priebe MG. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: What relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(6):715–21.
  92. Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. 2013;54(9):2325–40.
  93. Namasivayam S, Maiga M, Yuan W, Thovarai V, Costa DL, Mittereder LR, et al. Longitudinal profiling reveals a persistent intestinal dysbiosis triggered by conventional anti-tuberculosis therapy. *Microbiome*. 2017 Dec 7;5(1):71.
  94. Wipperfman MF, Fitzgerald DW, Juste MAJ, Taur Y, Namasivayam S, Sher A, et al. Antibiotic treatment for Tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed. *Sci Rep*. 2017 Dec 7;7(1):1–11.
  95. Khan N, Vidarthi A, Nadeem S, Negi S, Nair G, Agrewala JN. Alteration in the Gut Microbiota Provokes Susceptibility to Tuberculosis. *Front Immunol*. 2016 Nov 28;7:529.
  96. Winglee K, Eloë-Fadrosh E, Gupta S, Guo H, Fraser C, Bishai W. Aerosol mycobacterium tuberculosis infection causes rapid loss of diversity in gut microbiota. *PLoS One*. 2014;9(5):1–9.
  97. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(3):979–84.
  98. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol*. 2015 Dec 11;15(1):100.
  99. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):4–9.
  100. Ley R, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022–3.
  101. Cardona P-J, Vilaplana C. Multiple consecutive infections might explain the lack of protection by BCG. *PLoS One*. 2014;9(4).

102. Ordway DJ, Orme IM. Animal models of mycobacteria infection. Vol. 2011, Current Protocols in Essential Laboratory Techniques. 2011. 1–50 p.
103. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, Santangelo M de la P, et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*. 2013 Jan 27;4(1):3–66.
104. Brennan PJ. The Envelope of Mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64(1):29–63.
105. Glickman MS, Jacobs WR. Microbial Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a Discipline. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):477–85.
106. Middlebrook G, Dubos RJ, Pierce C. Virulence and Morphological Characteristics of Mammalian Tubercle Bacilli. *J Exp Med*. 1947;86(2):175–84.
107. Bloch H. Studies on the virulence of tubercle bacilli; isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J Exp Med*. 1950;91:197–218.
108. Noll H, Bloch H. Studies on the chemistry of the cord factor of Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem*. 1955 May 1;214(1):251–65.
109. Glickman MS. Cording, Cord Factors, and Trehalose Dimycolate. In: *The Mycobacterial Cell Envelope*. American Society of Microbiology; 2008. p. 63–73.
110. Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, et al. Deletion of *kasB* in Mycobacterium tuberculosis causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5157–62.
111. Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR. A Novel Mycolic Acid Cyclopropane Synthetase Is Required for Cording, Persistence, and Virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Cell*. 2000 Apr 1;5(4):717–27.
112. Caceres N, Vilaplana C, Prats C, Marzo E, Llopis I, Valls J, et al. Evolution and role of corded cell aggregation in Mycobacterium tuberculosis cultures. *Tuberculosis*. 2013;93(6):690–8.
113. Julián E, Roldán M, Sánchez-Chardi A, Astola O, Agustí G, Luquin M. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of Mycobacterium tuberculosis, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *J Bacteriol*. 2010;192(7):1751–60.
114. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):270–99.

115. Rabot S, Membrez M, Blancher F, Berger B, Moine D, Krause L, et al. High fat diet drives obesity regardless the composition of gut microbiota in mice. *Sci Rep.* 2016;6:1–11.
116. Algoblan A, Alalfi M, Khan M. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2014 Dec 4;7:587.
117. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* 2012;166(3):877–94.
118. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res.* 2001;50:536–46.
119. Restrepo BI. Diabetes and Tuberculosis. In: *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections, Seventh Edition.* American Society of Microbiology; 2016. p. 595–606.
120. Higa TS, Spinola A V., Fonseca-Alaniz MH, Anna Evangelista FS. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2014;6(1):47–54.
121. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity.* 2011;19(6):1109–17.
122. Smith CM, Proulx MK, Olive AJ, Laddy D, Mishra BB, Moss C, et al. Tuberculosis susceptibility and vaccine protection are independently controlled by host genotype. *MBio.* 2016;7(5):1–13.
123. Gil O, Guirado E, Gordillo S, Díaz J, Tapia G, Vilaplana C, et al. Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis* is related to bacterial load rather than to any one cytokine or T cell type. *Microbes Infect.* 2006;8(3):628–36.
124. Flynn JAL. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect.* 2006;8(4):1179–88.
125. Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, et al. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing Strains Upregulate Type I IFNs and Increase Expression of Negative Regulators of the Jak-Stat Pathway. *J Interf Cytokine Res.* 2005;25(11):694–701.
126. Erkens CGM, Kamphorst M, Abubakar I, Bothamley GH, Chemtob D, Haas W, et al. Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: A European consensus. *Eur Respir J.* 2010;36(4):925–49.
127. de Noronha ALL, Báfica A, Nogueira L, Barral A, Barral-Netto M. Lung

- granulomas from *Mycobacterium tuberculosis*/HIV-1 co-infected patients display decreased in situ TNF production. *Pathol Res Pract*. 2008;204(3):155–61.
128. Dutta NK, Illei PB, Jain SK, Karakousis PC. Characterization of a novel necrotic granuloma model of latent tuberculosis infection and reactivation in mice. *Am J Pathol*. 2014;184(7):2045–55.
  129. Dalby MJ, Ross AW, Walker AW, Morgan PJ. Dietary Uncoupling of Gut Microbiota and Energy Harvesting from Obesity and Glucose Tolerance in Mice. *Cell Rep*. 2017;21(6):1521–33.
  130. Brima W, Eden DJ, Mehdi SF, Bravo M, Wiese MM, Stein J, et al. The brighter (and evolutionarily older) face of the metabolic syndrome: evidence from *Trypanosoma cruzi* infection in CD-1 mice. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015 May 1;31(4):346–59.
  131. Rosshart SP, Vassallo BG, Angeletti D, Hutchinson DS, Morgan AP, Takeda K, et al. Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell*. 2017;171(5):1015-1028.e13.
  132. Maji A, Misra R, Dhakan DB, Gupta V, Mahato NK, Saxena R, et al. Gut microbiome contributes to impairment of immunity in pulmonary tuberculosis patients by alteration of butyrate and propionate producers. *Environ Microbiol*. 2018;20(1):402–19.
  133. Zheng H, Chen M, Li Y, Wang Y, Wei L, Liao Z, et al. Modulation of Gut Microbiome Composition and Function in Experimental Colitis Treated with Sulfasalazine. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Sep 7 [cited 2019 Sep 13];8:1703. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01703/full>
  134. Cong Y, Feng T, Fujihashi K, Schoeb TR, Elson CO. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(46):19256–61.
  135. Zhao Q, Elson CO. Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology*. 2018;154(1):28–37.
  136. Li S, Wang Z, Yang Y, Yang S, Yao C, Liu K, et al. Lachnospiraceae shift in the microbial community of mice faecal sample effects on water immersion restraint stress. *AMB Express*. 2017 Dec 17;7(1):82.
  137. Liu X, Zeng B, Zhang J, Li W, Mou F, Wang H, et al. Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice. *Sci Rep*. 2016;6:1–11.
  138. Kim E, Kim DB, Park JY. Changes of mouse gut microbiota diversity and

- composition by modulating dietary protein and carbohydrate contents: A pilot study. *Prev Nutr Food Sci.* 2016;21(1):57–61.
139. Costello ME, Ciccia F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, et al. Brief Report: Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(3):686–91.
  140. Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, et al. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun.* 2013;81(3):965–73.
  141. Langille MGI, Meehan CJ, Koenig JE, Dhanani AS, Rose RA, Howlett SE, et al. Microbial shifts in the aging mouse gut. *Microbiome.* 2014;2(1):1–12.
  142. Zhang C, Zhang M, Pang X, Zhao Y, Wang L, Zhao L. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J.* 2012;6(10):1848–57.
  143. Chiodini RJ, Dowd SE, Chamberlin WM, Galandiuk S, Davis B, Glassing A. Microbial population differentials between mucosal and submucosal intestinal tissues in advanced Crohn’s disease of the ileum. *PLoS One.* 2015;10(7):1–19.
  144. Huang C, Chen J, Wang J, Zhou H, Lu Y, Lou L, et al. Dysbiosis of Intestinal Microbiota and Decreased Antimicrobial Peptide Level in Paneth Cells during Hypertriglyceridemia-Related Acute Necrotizing Pancreatitis in Rats. *Front Microbiol.* 2017 May 4;8:776.
  145. Million M, Tomas J, Wagner C, Lelouard H, Raoult D, Gorvel J-P. New insights in gut microbiota and mucosal immunity of the small intestine. *Hum Microbiome J.* 2018 Apr 1;7–8:23–32.
  146. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med.* 2017;23(1):107–13.
  147. Loy A, Pfann C, Steinberger M, Hanson B, Herp S, Brugiroux S, et al. *schaedleri*, a Core Member of the Murine Gut Microbiota. *mSystems.* 2017;2(1):e00171-16.
  148. Cooper AM, Callahan JE, Keen M, Belisle JT, Orme IM. Expression of memory immunity in the lung following re-exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 1997;78(1):67–73.
  149. Kamath AB, Behar SM. Anamnestic responses of mice following *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2005 Sep 1;73(9):6110–

- 8.
150. Orme IM. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 1988 May 15;140(10):3589–93.
151. Zelmer A, Stockdale L, Prabowo SA, Cia F, Spink N, Gibb M, et al. High monocyte to lymphocyte ratio is associated with impaired protection after subcutaneous administration of BCG in a mouse model of tuberculosis. *F1000Research.* 2018;7(0):296.
152. Tzelepis F, Blagih J, Khan N, Gillard J, Mendonca L, Roy DG, et al. Mitochondrial cyclophilin D regulates T cell metabolic responses and disease tolerance to tuberculosis. *Sci Immunol.* 2018 May 11;3(23):eaar4135.
153. Pérez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martín C. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol.* 2001;41(1):179–87.
154. Barkan D, Hedhli D, Yan H-G, Huygen K, Glickman MS. *Mycobacterium tuberculosis* lacking all mycolic acid cyclopropanation is viable but highly attenuated and hyperinflammatory in mice. *Infect Immun.* 2012 Jun 1;80(6):1958–68.





## 9. ANEXOS



## Influence of gut microbiota on progression to tuberculosis generated by high fat diet-induced obesity in C3HeB/FeJ Mice

Lilibeth Arias<sup>1, 2, 3</sup>, Galo A. Goig<sup>4</sup>, Paula Cardona<sup>1, 2, 3</sup>, Manuela Torres-Puente<sup>5</sup>, Jorge Diaz<sup>1</sup>, Yaiza Rosales<sup>1</sup>, Eric Garcia Aguilera<sup>1</sup>, Gustavo Tapia<sup>6</sup>, Iñaki Comas<sup>1</sup>, Cristina Vilaplana<sup>7, 2, 8</sup>, Pere-Joan Cardona<sup>1, 2, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Tuberculosi Experimental, Germans Trias i Pujol Health Science Research Institute (IGTP), Spain, <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain, <sup>3</sup>Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Tuberculosis Genomics Unit, Institute of Biomedicine of Valencia, Superior Council of Scientific Investigations (CSIC), Spain, <sup>5</sup>Tuberculosis Genomic Unit, Institute of Biomedicine of Valencia, Superior Council of Scientific Investigations (CSIC), Spain, <sup>6</sup>Pathology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Spain, <sup>7</sup>Unitat de Tuberculosi Experimental, Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Spain, <sup>8</sup>Germans Trias i Pujol Health Science Research Institute (IGTP), Spain

**Submitted to Journal:**  
Frontiers in Immunology

**Specialty Section:**  
Nutritional Immunology

**Article type:**  
Original Research Article

**Manuscript ID:**  
483025

**Received on:**  
11 Jul 2019

**Revised on:**  
03 Sep 2019

**Frontiers website link:**  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

---

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

### **Author contribution statement**

PJC led the project. CV, IC and PJC conceived and planned the experiments. LA, PC, JD, YR, GAG, MTP and EG carried out the experiments. LA, GAG, PC, IC, CV and PJC contributed to interpretation of the results. LA, CV and PJC took the lead in writing the manuscript. All authors contributed to drafting the work; and gave final approval for the version to be published. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

### **Keywords**

Gut Microbiota, Tuberculosis, high fat diet, Obesity, Comorbidity, BCG, Mice, C3HeB/FeJ

### **Abstract**

Word count: 224

The administration of a high fat content diet is an accelerating factor for metabolic syndrome, impaired glucose tolerance and early type 2 diabetes. The present study aims to assess the impact of a high fat diet on tuberculosis progression and microbiota composition in an experimental animal model using a C3HeB/FeJ mouse strain submitted to single or multiple consecutive aerosol infections. These models allowed us to study the protection induced by Bacillus Calmette-Guérin vaccination as well as by the natural immunity induced by chemotherapy after a low dose Mycobacterium tuberculosis infection. Our results show that a high fat diet is able to trigger a pro-inflammatory response, which results in a faster progression towards active tuberculosis and an impaired protective effect of BCG vaccination, which is not the case for natural immunity. This may be related to dysbiosis and a reduction in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the gut microbiota caused by a decrease in the abundance of the Porphyromonadaceae family and, in particular, the Barnesiella genus. It should also be noted that a high fat diet is also related to an increase in the genera Alistipes, Parasuterella, Mucispirillum and Akkermansia, which have previously been related to dysbiotic processes. As diabetes mellitus type 2 is a risk factor for developing tuberculosis, these findings may prove useful in the search for new prophylactic strategies for this population subset.

### **Contribution to the field**

Tuberculosis (TB) is the top killer infectious disease in the world with more than 1.5 million of deaths and 10 million people fell ill with TB in 2017. The WHO has published the End TB Strategy with the goal to reduce TB-related deaths and incidence of TB. One of the targets is research of new vaccine candidates with an improved efficacy compared to Bacillus Calmette-Guérin (BCG) the only licensed vaccine for TB prevention. Furthermore, the management of TB becomes more difficult in the presence of comorbidities particularly type II diabetes due to the recent epidemic of the disease. Its study together with other related disease as metabolic syndrome and obesity is needed to accomplish WHO goals. We have developed a new animal model focusing in the study of gut microbiota changes and their contribution in TB development and studying their impact in BCG vaccination. We propose the TB-obesity comorbidity model as a new animal model useful to test new vaccine candidates. We have also made new contributions in the study of gut microbiota, which is clearly affected by diet, and its relation with TB progression.

### **Funding statement**

This work was supported by the European Commission Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement TBVAC2020 No. 643381, European Research Council research grant 638553-TB-ACCELERATE and Ministerio de Economía y Competitividad (Spanish government) research grant SAF2017-92345-EXP (to IC). CV has a project Servet II contract funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, CPII 18/00031). LA received an Improvement and Mobility Program grant from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). GAG contract was funded by Ministerio de Economía y Competitividad (Spanish Government) (BES-2014-071066). PC contract was funded by the Instituto de Salud Carlos III (IFI14/00015). GAG contract was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2014-071066). The Experimental Tuberculosis Unit is accredited by the Catalan Agency for Management of University and Research Grants with code 2017 SGR500 and the IGTP is a member of the CERCA network of institutes. The funders played no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Ethics statements**

**Studies involving animal subjects**

Generated Statement: The animal study was reviewed and approved by Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (registered as B9900005).

**Studies involving human subjects**

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

**Inclusion of identifiable human data**

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

**Data availability statement**

Generated Statement: The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

In review

## Influence of gut microbiota on progression to tuberculosis generated by high fat diet-induced obesity in C3HeB/FeJ Mice

Lilibeth Arias<sup>1,2,3</sup>, Galo Adrián Goig<sup>4</sup>, Paula Cardona<sup>1,2,3</sup>, Manuela Torres-Puente<sup>4</sup>, Jorge Díaz<sup>1</sup>, Yaiza Rosales<sup>1</sup>, Eric Garcia<sup>1</sup>, Gustavo Tapia<sup>5</sup>, Iñaki Comas<sup>4,6</sup>, Cristina Vilaplana<sup>1,2,3</sup>, Pere-Joan Cardona<sup>1,2,3\*</sup>.

<sup>1</sup>*Experimental Tuberculosis Unit (UTE), Fundació Institut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain*

<sup>2</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain*

<sup>3</sup>*Department of Genetics and Microbiology, Can Ruti Campus, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Badalona, Spain*

<sup>4</sup>*Tuberculosis Genomics Unit (TGU). Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), Spain*

<sup>5</sup>*Pathology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTIP), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Badalona, Spain*

<sup>6</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain*

\*Correspondence:

Prof. Dr. Pere-Joan Cardona

[pj.cardona@gmail.com](mailto:pj.cardona@gmail.com)

### Abstract

The administration of a high fat content diet is an accelerating factor for metabolic syndrome, impaired glucose tolerance and early type 2 diabetes. The present study aims to assess the impact of a high fat diet on tuberculosis progression and microbiota composition in an experimental animal model using a C3HeB/FeJ mouse strain submitted to single or multiple consecutive aerosol infections. These models allowed us to study the protection induced by Bacillus Calmette-Guérin vaccination as well as by the natural immunity induced by chemotherapy after a low dose *Mycobacterium tuberculosis* infection. Our results show that a high fat diet is able to trigger a pro-inflammatory response, which results in a faster progression towards active tuberculosis and an impaired protective effect of BCG vaccination, which is not the case for natural immunity. This may be related to dysbiosis and a reduction in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the gut microbiota caused by a decrease in the abundance of the Porphyromonadaceae family and, in particular, the *Barnesiella* genus. It should also be noted that a high fat diet is also related to an increase in the genera *Alistipes*, *Parasuterella*, *Mucispirillum* and *Akkermansia*, which have previously been related to dysbiotic processes. As diabetes mellitus type 2 is a risk factor for developing tuberculosis, these findings may prove useful in the search for new prophylactic strategies for this population subset.

**Keywords:** Tuberculosis, high fat diet, obesity, comorbidity, BCG, mice, gut microbiota, C3HeB/FeJ.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) is still a major challenge facing humanity in the 21st century. Since the declaration by the World Health Organization of a global emergency 25 years ago, the absolute number of cases seems to have stabilized. However, the reduction in incidence of around 1.5% is far from the value of 25% needed to achieve the 2025 objective (1).

Several factors, including severe immunosuppression (caused by HIV, immunosuppressive drugs or anti-TNF antibodies), alcoholism and tobacco smoking, have been reported to increase the probability of developing TB (2). One of the most important factors is malnutrition (3,4). A reduction in body mass index (BMI) to below 18 has been shown to be a strong risk factor for TB (5). In several infectious diseases, such as community-acquired pneumonia, sepsis, Chagas disease or TB, there are consistent epidemiological data showing the advantages of obesity, with negative outcomes being inversely related to BMI. This benefit can also be seen for a variety of surgical and non-surgical conditions (6,7). This means that subjects with better nutrition, more body fat and highly activated immune functions are more likely to survive. Metabolic syndrome intensifies with an increase in adiposity, thereby raising the level of immune protection, which at the same time is counterbalanced by the deleterious effects of dysglycemia. This process is known as the “obesity paradox”(6).

In contrast, it is well known that diabetes mellitus type 2 (DM2) is also a risk factor for TB (8), although this is also linked to obesity and, therefore, an increased BMI. This new link is specially worrying considering the overwhelming increase in DM2 incidence in high TB burden countries, such as India and South Africa (9,10). Obesity, insulin resistance and DM2 are closely associated with a chronic state of low-grade inflammation (11). In particular, in obesity there is an over-expression of TNF- $\alpha$ , which attracts M1 macrophages, thereby increasing the levels of inflammatory mediators such as C-reactive protein, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 and IFN- $\gamma$ . In this sense, DM2 also results in an increase in neutrophils and monocyte-secreted cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8. In addition, there is an impairment in infection-induced cytokine production and a reduction in phagocytic and antibacterial activity. DM2 decreases the level of regulatory T cells (Tregs) while increasing Th17, thus promoting an exaggerated inflammatory response (12).

A high fat diet (HFD) has been linked to an increased diversity in the intestinal microbiota, thus providing an anti-inflammatory milieu (13), and a decrease in the Firmicutes to Bacteroidetes (F/B) ratio, which has been related to glucose intolerance (14). In an experimental model of TB using BALB/c mice, infection induced an initial decrease in microbiota diversity, which tended to recover with chronification. This work highlights the significant decrease in Clostridiales (phylum Firmicutes), as

promoters of Tregs, and Bacteroidales (phylum Bacteroidetes), as inducers of IL-10-producing T cells and modulators of the Th1/Th2 balance (15). Recent studies of an experimental model in C57BL/6J-CD45a mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) demonstrated the rapid dysbiosis caused by conventional TB chemotherapy, with this condition persisting for a long time after cessation (16). The impact of standard treatment (HRZE) in TB patients has also been assessed, demonstrating a long-lasting microbiota dysbiosis with a variation in several species of the Firmicutes and Bacteroidetes phyla (17). Interestingly, both studies showed an increased abundance of the Erysipelotrichaceae family, which, in contrast to other Firmicutes, has been linked to a pro-inflammatory milieu (18). Curiously, a recent study in a human cohort has shown an increase in the gut microbiota diversity in TB patients. This is an interesting finding given that the BMI of TB patients was significantly lower than for healthy controls (19).

The first objective of this study was to evaluate the role of HFD-induced obesity in the development of TB in an active TB murine model using the C3HeB/FeJ mouse strain (20) by assessing the bacillary load (BL), pathology and cytokine profiles in lungs, survival rates, and gut microbiota content. We also evaluated the effect of multiple consecutive infections versus a single aerosol infection. This is a better way of mimicking the scenario of household contacts, where subjects are at high risk of developing TB due to their daily contact with a TB patient and those persons that live in regions with a high infection risk (21). In this complex scenario, we tested the influence of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination and natural infection on disease progression.

As there is a lack of animal studies regarding the mechanisms behind the DM2-TB comorbidity, which are key to better understanding the pathology and improving the management of the disease, we believe this research represents a significant contribution to the field by providing an animal model for testing TB vaccines in a context of obesity and early DM2, an issue closely related to current society.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Experimental design**

Two different experiments were planned in order to evaluate: a) the effect of HFD-induced obesity on the mouse model of active TB using the C3HeB/FeJ strain (comorbidity model), as well as BCG vaccination and two different types of challenge (single infection or multiple consecutive infections (SI or MCI)); and b) the effect of BCG vaccination compared to natural immunity (NI) in the same comorbidity model.

Table 1 shows the experimental design of both experiments and Table 2 the experimental groups and experimental conditions used.

In the first experiment (n=240), four groups were subcutaneously vaccinated with  $10^6$  colony-forming units (CFU) of BCG Live U.S.P vaccine (SII-ONCO-BCG®); the



four remaining groups were sham vaccinated. After twelve weeks, mice were challenged with a low dose aerosol to deliver around 50 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv Pasteur strain to the lungs using an airborne infection apparatus (Glas-col Inc., Terre Haute, IN, USA). In the case of MCI, this challenge was done by infecting animals eight times over a period of five days. Animals were euthanized at week 3 (n=5 per group), week 4 (n=5 per group, except for group normal diet (ND) and MCI with n=4) and week 16 (n=10 per group) post-infection (p.i.). BL and pathology in lungs were analyzed. Lung samples at week 4 were also used to evaluate immune responses. Fecal samples (n=5 per group) were obtained at weeks 4 and 16 in order to analyze microbiota composition. The 10 remaining animals per group were allocated to assess impact on survival.

In the second experiment, the protective effect of BCG vaccination in MCI mice obtained from experiment 1 was compared to NI in MCI animals (n=30). NI was used to evaluate the memory-immune response protection after *M. tuberculosis* challenge. To evaluate NI, animals were challenged with a SI of low dose aerosol and animals were left two weeks to develop immunity. Then, animals were treated with isoniazid and rifapentine (25 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) for 10 weeks from week 2 p.i., to sterilize lungs. In order to test whether undetectable BL was achieved, 3 animals of each group were euthanized and lung samples were plated. No CFU counts were detected after 21 days of incubation period (limit of detection = 10 CFU) (data not shown) as described in previous works (22–24). Two weeks after stopping antibiotic treatment, animals were challenged with MCI. Fecal samples (n=5 per group) were obtained at week 4 in order to analyze microbiota composition. Differences in protection were assessed by survival (n=10 per group).

## **2.2. Animals**

Female C3HeB/FeJ specific-pathogen-free mice (6–8 weeks old) were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA), and all procedures were conducted in a BSL-3 facility. Animals were maintained on a 12 h light-dark cycle in a temperature- and humidity-controlled room. Animals from non-obese experimental groups were fed with ND containing 13% calories from fat (2014S Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Envigo). Animals from those experimental groups in which obesity was assessed were fed with an HFD containing 60.3% calories from fat (TD.06414 Adjusted Calories Diet (60/Fat), Envigo). Animal weight was recorded weekly.

## **2.3. Ethics**

All procedures were performed according to protocol DMAH6119, which was reviewed by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (registered as B9900005) and approved by the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural of the Catalan Regional Government, according to current national and European Union

legislation regarding the protection of experimental animals. Mice were supervised daily following a strict monitoring protocol in order to ensure animal welfare, and euthanized, if required, with isoflurane (inhalation excess).

#### **2.4. Oral glucose tolerance test**

Oral glucose tolerance test was performed 11 weeks after diet feeding. After overnight fasting period, mice were administered with 2g glucose/kg body weight by oral gavage. Blood samples were taken at 0, 15, 30, 60 and 120 min and glucose levels were measured with a glucometer (Accutrend Plus, Roche Diagnostics, Switzerland).

#### **2.5. Bacillary load**

Left lung samples from each animal were collected, homogenized and several dilutions plated on nutrient Middlebrook 7H11 agar (BD Diagnostics, Spark, USA). Visible CFU were counted after incubation for 28 days at 37°C.

#### **2.6. Lung Pathology**

Right lower lung lobe samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and 5- $\mu$ m sections stained with hematoxylin-eosin for microscopic observation and analysis of the damaged area using the NISElements D version 3.0x software package (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan). Four recuts of a block containing all group samples were used to determine the damaged area as a percentage of total lung area. Moreover, the proportion of exudative lesions in the total damaged area was measured to obtain the relative exudative area.

#### **2.7. Survival**

The effect on survival was evaluated in ten animals from each group. Animals were euthanized according to the humanized end-point protocol approved by the ethics committee.

#### **2.8. Cytokine profile analysis**

A cytokine profile study was performed in lung homogenates from right upper and middle lobes. The following cytokines were measured by Luminex xMAP<sup>®</sup> technology: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), IL-2, IL-6, IL-10, IL12, IL-17, CXCL1 and CXCL5. Results are expressed as pg per ml of supernatant. The assay was performed with the MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP kit (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) following the manufacturer's instructions and analyzed with xPONENT Software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

## 2.9. Microbiota analysis

### 2.9.1. Sample processing and DNA extraction

Cecum from the animals was extracted and stored at -80°C until DNA extraction. Samples were thawed on ice and stools separated from the intestinal epithelia. DNA was extracted using a QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) according to the manufacturer's instructions. Three 4 mm glass beads were added in the first step before vortexing to enhance cell lysis. The total volume of eluate was stored at -20°C until concentration measurement. DNA concentrations of the extracts were measured fluorometrically using the Qubit dsDNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). DNA was stored at -20°C until 16S rRNA gene library preparation.

### 2.9.2. 16S rRNA Gene Sequencing

Microbial DNA was analyzed using the Illumina *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* guide, with some modifications. The protocol targets the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene, which were amplified using the KAPA HiFi HotStart PCR Kit (KAPA Byosystems, Wilmington, MA, USA). The composition of a typical PCR was as follows: 1X KAPA HiFi Fidelity Buffer, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM KAPA dNTP Mix, 0.3 μM primers, 0.5 U KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase and 15 ng DNA template. The PCR program with Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg, Germany) consisted of the following steps: initial denaturation at 95°C for 3 min, 18 cycles at 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 4 minutes. The expected product size was approximately 550 bp. The PCR products were purified using Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA) using a Magnetic Stand-96 (Thermo Fisher Scientific). The PCR products were quality controlled with a 1.4% Agarose Gel. The Index PCR was performed using Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) and KAPA HiFi HotStart PCR Kit as follows: 1X KAPA HiFi Fidelity Buffer, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM KAPA dNTP Mix, 0.3 μM primers, 0.5 U KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase and 5 μL of Nextera XT Index 1 Primers and Nextera XT Index 2 Primers per sample. The procedure was performed as described in the *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* guide. Library products were purified as PCR products. The final DNA concentrations of the purified products were measured using a Qubit 3.0 fluorimeter (Thermo Fisher Scientific) and validated with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The purified products were diluted to a final concentration of 4 nM and pooled. The pool was denatured and sample loaded, as per the *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* guide, at a final concentration of 7 pM. The 16S rRNA gene libraries were sequenced with 2 x 300 paired-end reads using the Illumina MySeq system (Illumina).

## 2.10. Statistics, sequence processing and bioinformatics data analysis

The nonparametric Mann-Whitney test was used to make comparisons between groups using Graphpad Prism (GraphPad software v6.0, La Jolla, California, USA). Survival curves were created using the product limit method of Kaplan and Meier and were compared using the log-rank test. Body weight increase slopes were compared using linear regression test. Statistically significant differences are designated as follows: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 2.10.1. Immune response analysis

A three-way ANOVA was used to assess the effect of diet, infection and BCG vaccination on the immune response in lungs. A logarithmic transformation was applied to normalize the cytokine concentrations. In order to obtain equally sized samples, the missing value in the ND-MCI group was replaced by the mean for the group. Holm-Sidak multiple comparisons were performed using the means of groups differing in only one factor. Plotting and statistical analysis were carried out using Graphpad Prism (GraphPad software v7.0, La Jolla, California, USA).

The immune response in lungs was also analyzed by Principal Component Analysis (PCA) using RStudio (version 1.1.463). PC1 and PC2 represent the two principal components that contribute to most of the variance. The direction of the arrows and their lengths represent the contribution and strength of each principal component. Cytokine concentration levels were scaled to unit variance.

### 2.10.2. Bacterial diversity analysis

The resulting read files were analyzed using mothur pipeline (version 1.39.5). Paired-end reads were joined and quality controlled. Sequences were aligned using the SILVA reference database. Those alignments that did not fit exactly with our region of interest were removed. Sequences were pre-clustered and chimeric sequences were identified and removed, then taxonomically classified using RDP (ribosomal database project). Sequences classified as chloroplasts, mitochondria, archaea and eukaryote were eliminated. The distances between sequences were calculated with a distance cut-off of 0.03. After creating the distance matrix, sequences with >97% similarity were clustered into operational taxonomic units (OTUs). These OTUs were filtered and only those that had more than 0.1% relative abundance and were in at least two samples were conserved. Each OTU was assigned to a taxonomic classification. OTUs were classified into the last taxonomic rank possible, with genus being the furthest rank allowed by the method used. Rarefaction curves, diversity and richness indexes and distances between samples were calculated and plotted using RStudio (version 1.0.143). Diversity was quantified using the Bray-Curtis dissimilarity test and plotted using *non-metric multidimensional scaling* (NMDS). Beta diversity (Shannon's, Simpson's and Inverse Simpson's index) was calculated to analyze differences in diversity between samples.

### 3. RESULTS

#### 3.1. HFD determines the spectrum of body weight before and after infection

The animals' weight was recorded weekly throughout the study. HFD was found to significantly increase body weight at two weeks after starting the diet. Before *Mtb* challenge there was a clear difference in the slope of the body weight increase between ND and HFD (Figure 1A-F; Supplementary Table S1; Supplementary Figure S1). However, this difference in the growth slope disappeared suddenly after the challenge for both SI (Figure 1B,C) and MCI (Figure 1E,F), with HFD exhibiting a sudden deceleration. BCG vaccination significantly increased body weight in the HFD group just six weeks after starting the diet (Figure 1G-L; Supplementary Figure S1). Animals also showed glucose intolerance and increased cholesterol and HDL (Supplementary Figure S2).

#### 3.2. BCG generates lower protection in mice fed with HFD in terms of BL in lung tissue

The BL in lungs was evaluated at weeks 3, 4 and 16 p.i.. No statistically significant differences were found in terms of BL when comparing diets, although HFD-BCG animals tended to have higher medians (Supplementary Figure S3). The type of challenge is a determinant factor in BL, and was found to be higher in almost all MCI groups (Supplementary Figure S4).

As expected, BCG decreased BL by approximately 1 log in the groups fed with ND. This effect was maintained over time (Figure 2 A,B). This improvement was not observed in HFD groups for either the SI or MCI challenge (Figure 2 C,D). It should be noted, however, that BCG vaccination was administered at the same time as HFD, before having differences in weight between groups.

#### 3.3. Early infiltration induced by BCG does not preclude a long-term reduction in pathology under HFD

Analysis of the histometry revealed different trends in the acute (weeks 3 and 4) and chronic (week 16) phases of infection (Figure 3). In the early stages of infection, and after SI, BCG-vaccinated animals exhibited less infiltration than sham-vaccinated animals if fed with ND. However, the opposite was observed in HFD-fed animals. In contrast, under MCI and ND conditions, vaccination resulted in larger damaged areas when compared to control animals. Under MCI and HFD conditions, although vaccinated mice exhibited more infiltration, this difference was not statistically significant as the sham group also presented a large damaged area. In the chronic phase, BCG induced less infiltration than sham-vaccinated mice under all conditions.

Lesions were classified as proliferative or exudative depending on their quality. Exudative lesions were present in all sham groups and were predominant after SI.

Most of the lesions in BCG-vaccinated animals were proliferative, with exudative lesions being present only in ND-MCI mice. Amongst the sham groups, HFD exhibited a higher percentage of exudative lesions than ND (Figure 4). Given the absence of exudative lesions in the acute phase, this measurement was only performed at week 16.

### 3.4. Cytokine profile analysis

Pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17, IL-12, IL-6 and TNF- $\alpha$ ), neutrophil recruitment chemokines (CXCL1 and CXCL5) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ) were analyzed at week 4 p.i. in lung homogenates.

Table 3 shows the p-value summary of the three-way ANOVA results. Infection was the factor responsible for the largest variation between cytokines and chemokines (significant in all except IL-2 and TGF- $\beta$ ). Similarly, IL-2 and IL-12 levels were significantly affected by BCG vaccination. Thus, the two dietary conditions alone had no significant effect on the cytokine profile. Some of the cytokines analyzed presented an interaction between different factors. For more detailed information, each individual value is illustrated in Figure S5 in Supplementary material. Briefly, pro-inflammatory cytokines were present in higher concentrations in MCI animals. In the case of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17, this increase was higher in mice fed with HFD. In fact, among SI, ND mice had higher levels of these immune mediators, with the opposite being found for MCI. The same pattern was observed for CXCL1 and CXCL5. The levels of anti-inflammatory IL-10 or TGF- $\beta$  did not differ significantly between the experimental groups.

A PCA was performed for all inflammatory mediators (Figure 5). The first two components explain 71.51% of the variation among samples, with the main contributions to PC1 coming from CXCL1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 and IL-6. PC2, in contrast, is mostly explained by CXCL5 and TGF- $\beta$ . The unvaccinated HFD-MCI animals presented higher PC1 values, whereas HFD-SI animals had higher levels of PC2. As concluded from the three-way ANOVA analysis, the type of infection was the factor with the greatest influence on the inter-sample variation.

### 3.5. BCG vaccination does not increase survival under HFD, whereas NI does

Differences in survival rates were analyzed using the Log-rank test (Figure 6). Irrespective of their vaccination status, MCI mice had lower survival rates than their SI counterparts, and HFD always presented a lower median survival time (MST). BCG was able to significantly increase survival rates irrespective of the type of challenge under ND (MST from 28 to 34 weeks for SI and MST from 19 to 24 weeks for MCI) but not under HFD feeding. Interestingly, NI induced in animals following antibiotic treatment after SI, until no detectable CFU was achieved, was protective in HFD but not in ND (Figure 7).

### 3.6. HFD-induced obesity and chemotherapy reduce gut microbiota diversity

The gut microbiota studies were performed at weeks 4 and 16 post-infection, corresponding to weeks 16 and 28 from the beginning of the diet. In our study, OTUs can be considered as the species found in fecal samples. Given the same number of reads sequenced, a smaller number of OTUs were found in HFD samples at both time points (Figure 8 A,B), thus suggesting a lower microbial diversity.

We then assessed the dissimilarity between both diets in terms of microbiota composition using an NMDS plot and the Bray-Curtis dissimilarity index. Samples were grouped according to the type of diet, showing that microbiota composition differs substantially between diet conditions (Figure 8C). Other comparisons were performed to evaluate the influence of BCG vaccination and infection dose on microbiota composition. This analysis was performed separately for the ND and HFD groups, showing no significant differences (Supplementary Figure S6).

Once the dissimilarity between diets had been confirmed, Shannon, Simpson and Inverse Simpson indexes were used to demonstrate the existence of real differences in microbiota diversity between the different nutritional statuses. These indexes showed that ND mice had a statistically significantly higher diversity than HFD groups (Figure 8D).

The relative abundance of Firmicutes and Bacteroidetes phyla and the ratio between them were analyzed at both time points, namely week 16 (Figure 9A,G) and week 28 (Figure 10A,G). This analysis showed an inverse correlation between the relative abundance of Bacteroidetes and the animals' weight, with the F/B ratio being higher in HFD mice due to the reduction in Bacteroidetes.

The detailed gut microbiota composition results are shown in Figures 9 (week 16) and 10 (week 28). Analysis of the most abundant families showed a significant increase in Ruminococcaceae and Rikenellaceae, and a reduction in Porphyromonadaceae with HFD at week 28. Among the genera from the Firmicutes phylum, mice fed with HFD showed a higher abundance of *Acetatifactor*, *Anaerotruncus*, *Clostridium XIVa* and *Oscillibacter* at week 28. In contrast, analysis of genera from the Bacteroidetes phylum showed that HFD mice had a lower abundance of *Alistipes* at week 16 than ND, whereas the opposite was the case at week 28. The levels of the *Barnesiella* genus are markedly higher in ND-fed animals at all time points, whereas *Parasuterella* (Proteobacteria) is higher in HFD. It is interesting to note the predominance of the *Akkermansia* genus at both time points, and the appearance of *Mucispirillum* at the last time point, in HFD-fed mice.

The effect of chemotherapy used to induce NI was also assessed on gut microbiota (Figure 11). Results indicated that chemotherapy decreased the F/B ratio in ND due to both a decreased abundance of Firmicutes and increased levels of Bacteroidetes.

Interestingly, chemotherapy showed the same trend for HFD, although the differences were not statistically significant. In the Firmicutes phylum, Lachnospiraceae and Ruminococcaceae were reduced with chemotherapy in both diets, whereas for Bacteroidetes, the Porphyromonadaceae family increased with chemotherapy. Finally, the genus *Akkermansia* was substantially increased with chemotherapy in ND.

#### 4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first time that diet-induced obesity has been studied in an experimental TB model. We have chosen to test the impact of an HFD as obesity inducer as this is the most robust and best characterized model for inducing metabolic syndrome and glucose intolerance, which are the main factors leading to DM2 (14). Although our model was able to induce a marked increase in body weight, we did not observe a constant hyperglycemia and animals had no need for insulin treatment. Indeed, this is the current situation for millions of citizens with this syndrome who will go on to develop DM2 (25).

These variables are introduced in the context of the C3HeB/FeJ mouse, a unique strain that is able to reproduce the spectrum of human lesions and is considered to best reflect the progression from infection to disease (26). This progression differs from the general tolerance towards *Mtb* infection shown by inbred mice, which only develop proliferative lesions (27,28).

In view of recent data, our model is more complex than we initially thought. Dalby et al. (29) have demonstrated that refined diets reduce gut microbiota diversity and increase the F/B ratio irrespective of obesity or dietary fat. They showed that a refined low fat diet is also able to induce dysbiosis, with no link to obesity or hyperglycemia. In any case, a high F/B ratio favors glucose intolerance and is thus linked to an impaired immune response (14). As such, we have two independent factors that can explain the increased progression towards TB. First, although metabolic syndrome and DM2-related obesity, which are clearly linked to an immune dysfunction, have been observed in other models, this is not the case in ours. Pre-feeding with HFD for 8 weeks in CD-1 mice reduced the lethality of *Trypanosoma cruzi* infection by 35% (7). Secondly, dysbiosis and an increase in the F/B ratio. This has also been linked to a decreased resistance to disease in a study comparing wild mice with lab mice (30). On the other hand, *Mtb* infection has consistently been shown to be linked to a reduction in gut microbiota diversity (15,31). Our data show that HFD aggravates this tendency, thus resulting in a lower survival in animals fed with HFD.

Although there were no differences in BL between the diets, BCG only had a positive effect in ND mice, thus revealing a diminished protective capacity under HFD conditions. To the best of our knowledge, and with the exception of some experiments with a Beijing strain challenge (32), this is the first time that no protective effect has been seen upon BCG vaccination in mice in terms of BL



reduction. However, these strains are related to the induction of a different pattern of immune response after triggering an IFN type I response (33), therefore further studies are required to determine whether HFD also induces such a response.

Histometry studies shortly after the SI challenge showed an unusual reaction for the HFD group as these mice exhibit a stronger reaction after vaccination with BCG than with sham, in contrast to what occurs in ND animals. Even when this is not maintained throughout the chronic phase, it seems to be indicative of a delayed immune response. Moreover, MCI mice (both BCG and sham vaccinated) exhibit a stronger infiltration at all the time points studied, although a higher percentage of damaged area at week 3 after BCG vaccination in ND reflects a better immune response due to the vaccination. This different reaction in HFD correlates with the immune impairment of the response against TB linked to obesity and DM2, as seen above, although this chronic increase in the pro-inflammatory response does not result in the expected clear histological phenotype in terms of increasing the number of exudative lesions. This is in accordance with the intensity of the risk factor shown by DM2 (around x3), which is much lower than the risk factor for immunosuppression by anti-TNF or AIDS (around x100), where a clear phenotype can be seen.

As described by several authors, aerosol infection is able to induce two kinds of lesions in this model, namely proliferative lesions, which are characterized by a slow progression and spreading via infected foamy macrophages, and exudative lesions, in which neutrophils accumulate at the periphery, thereby fueling the extracellular bacillary growth that finally results in large-scale central necrosis (20,26,34,35). Surprisingly, our analysis of the quality of the lesions revealed larger exudative regions in SI animals than those MCI infected. As we are currently unable to explain this phenomenon, further studies in this regard are required.

The pulmonary cytokine profile showed that, for SI animals, there is a more pro-inflammatory profile in ND than in HFD fed mice, irrespective of vaccination status, thus confirming the delay in the onset of the immune response in HFD seen in the histometry. However, this pattern reverts when animals are challenged with MCI, thus receiving far higher bacillary counts. This strong pro-inflammatory response in HFD mice has no advantage in terms of BL reduction, a fact that may reflect a higher basal pro-inflammatory milieu. This could also explain the pathology results.

Data published by Rosshart et al. (30) regarding the ability of natural microbiota, in terms of diversity and F/B ratio, to benefit a balanced systemic and local inflammatory response, which in this case would have more similarities to ND than HFD fed mice, merit more in-depth studies, including mice fed with refined low fat diets (36). This is an important issue given the recent paper by Maji et al. (19), which found a higher diversity of the intestinal microbiome in TB patients compared with controls, thus resulting in a higher presence of short-chain fatty acids. These authors claim that these products, especially butyrate, have a strong anti-inflammatory effect

after stimulating Tregs in the gut, thus promoting IL-10 production and facilitating a chronic infection, which contradicts the concept of Rosshart et al. (30). Indeed, as highlighted by the authors, there is an important confusing factor in that study, namely the BMI, which is significantly lower in TB patients. It is well known that a low BMI has a major impact in TB and other diseases by inducing a global immune dysfunction as a consequence of protein-energy undernutrition, which impairs T-lymphocyte-mediated responses (37).

In our model, HFD caused gut microbiota dysbiosis, thus inducing a pro-inflammatory milieu that limits the bacteriome diversity. This caused an increase in the F/B ratio. These are the most important phyla in humans, with Bacteroidetes being reduced due to obesity and subsequently being restored, along with a reduction in Firmicutes, after losing body weight on a diet (38). The question now arises as to how this dysbiosis influences the fate of TB progression. The recent study by Rosshart et al. (30) links a high diversity and low F/B ratio to the promotion of host fitness and limited inflammatory responses against influenza A and colorectal tumorigenesis. This is coherent with our findings, which also point to a sort of “neutral effect” caused by the abundance of Porphyromonadaceae family, and specifically *Barnesiella*, found under ND conditions.

In our system, analysis of the microbiota showed differences with previous data obtained in mice fed with HFD. These differences are probably related to both *Mtb* infection and the time of feeding, as in our case the analysis was done after 16 and 28 weeks of feeding, which is far longer than the usual 8 to 12 weeks reported previously (14,36).

With regard to the Firmicutes phyla, ND presented lower levels (at week 28) of Ruminococcaceae, which is related to the production of short-chain fatty acids (39), thus triggering an anti-inflammatory response. It is interesting to note that the epitope expressed on the flagellin of the Lachnospiraceae, which becomes the most important Firmicutes family in both diets, is a potent inducer of Tregs and TGF- $\beta$  in dendritic cells in mice (40,41). Lachnospiraceae increased significantly in mice under stress. In this study, stress caused an increase in systemic corticoid, IFN- $\gamma$  and IL-17 levels, as well as mucosal injury (42). This is coherent with the stress induced by TB infection regardless of diet. At a genus level, and although they only represented a small percentage of the total microbiota, HFD presented an increase in *Clostridium XIVa*, which promotes the expansion of Tregs (41), as well as *Anaerotruncus* and *Acetatifactor*, which have been related to arthritis progression in mice, thus suggesting a pro-inflammatory response (43). Interestingly, we have also detected a total absence of the Lactobacillaceae family in C3HeB/FeJ mice. This is a relevant factor as, according to Winglee et al. (15), this is the predominant family (around 50% of relative abundance) in *Mtb*-infected C57BL/6 mice. Curiously, recent data from Namasyvayam et al. (16) in *Mtb*-infected C57BL/6J-CD45a(Ly5a) mice also found this family, but in a very low relative abundance (around 3%). As such, this may be a critical point in the gut microbiome of C3HeB/FeJ as it may be determinant

for triggering the strong inflammatory response that causes exudative lesions. Lactobacillaceae has also been related to a decrease in the inflammatory response, and thus immune balance, although this proposal remains controversial as it was reported in the context of inflammatory bowel disease (39).

The most remarkable differences caused by diet were seen in the Bacteroidetes phylum. Thus, HFD-fed mice showed significantly lower levels of the *Barnesiella* genus at both time points, along with an increase in the *Alistipes* genus with time. These changes may be crucial in the different evolution experimented by both groups. Thus, the most abundant family in both diets is Porphyromonadaceae, which is decreased under HFD conditions. Porphyromonadaceae is increased in mice fed with a high-protein/low carbohydrate diet (44) and decreased in mice fed with omega-6-polyunsaturated fatty acids (45). This has been related with the dysbiosis shown in patients with ankylosing spondylitis, a heritable immune-mediated arthropathy (46). The *Barnesiella* genus has proved useful for reducing the colonization of *Enterococcus* in a “neutral way” as it is not thought to be associated with immune development or inflammatory diseases in the intestine (47). In contrast, *Alistipes* is the most significant over-represented taxon related to frailty in the elderly (48) and is found to be increased under HFD conditions (49). Overall, it appears that colonization with the Porphyromonadaceae family, and in particular the *Barnesiella* genus, may have a positive impact on reducing the pro-inflammatory milieu in the gut.

With regard to Proteobacteria, HFD caused a sustained increase in the genus *Parasutterella*, which is precisely the opposite to what was found in C57BL/6 (49). Additional microbiome studies in humans and rats have associated an increased abundance of *Parasutterella* with dysbiosis in the gut, with this genus being increased in the submucosa of individuals with Crohn’s disease (50) and in rats with hypertriglyceridemia-related acute necrotizing pancreatitis (51).

Finally, HFD mice had a higher relative abundance of *Mucispirillum* and *Akkermansia* genera. Unlike the majority of commensal bacteria, *Akkermansia* and *Mucispirillum* evade T-independent IgA and elicit a T-dependent response (52). In contrast to our observations, the abundance of *Akkermansia muciniphila* is decreased during obesity and diabetes, and administration thereof can counteract the development of HFD-induced obesity and gut barrier dysfunction. Its effect is increased when given inactivated by pasteurization, a mechanism linked to the increase in mucus production (53). *Mucispirillum schaedleri* has been reported to be elevated in abundance during intestinal inflammation in mouse models, and has been described as a mucus-associated bacterium adapted to the oxidative burst that occurs during inflammation (54).

Another unknown was the effect caused by chemotherapy after aerosol infection. A more significant impact was found for the gut microbiota of ND mice, which could give a clue as to why natural infection was less effective in this group. Animals fed with ND presented a drastic reduction in the F/B ratio with chemotherapy. This is

mainly explained by a reduction in Lachnospiraceae for Firmicutes and an increase in Porphyromonadaceae for Bacteroidetes, thus increasing the “neutral” effect of the microbiota. Chemotherapy also markedly promoted the presence of the *Akkermansia* genus in ND, thus increasing T-cell stimulation. In view of these results, we can hypothesize that induction of a protective effect by natural infection might require a certain anti-inflammatory effect. This is coherent with recent findings suggesting that excess effector T-cell stimulation might be deleterious to a protective immune response (55,56). In HFD mice, in contrast, chemotherapy did not impact the abundance of Firmicutes, with the increase in several *Clostridium* appearing to “compensate” the loss of Ruminococcaceae and Lachnospiraceae. It also failed to impact the abundance of Bacteroidetes and triggered the presence of Enterobacteriaceae, which is difficult to analyze since it did not affect the levels of *Akkermansia*.

Overall, our findings show that HFD accelerates the progression towards active TB. Although we have not been able to discern the exact mechanism of action, our results point to a dysregulation in the ability to react to *Mtb* infection, which appears to slow the appearance of immunity in the early stages post-challenge. HFD-fed animals show a reduced ability to detect low dose infection, while reacting excessively to a high dose, thus leading to a reduced survival. This may be related to the HFD causing early DM2, as supported by a dysbiosis in the intestinal microbiota that promotes an intolerance to glucose. Interestingly, even when natural immunity induced by *Mtb* followed by chemotherapy is able to induce protection, BCG vaccination protection is reduced in terms of BL and survival. This finding highlights the need to further explore the mechanisms of this difference in order to design a better vaccine that can protect against this rapidly growing comorbidity, which is starting to hamper current efforts to control TB.

## 5. Abbreviations

TB	Tuberculosis
BMI	Body mass index
DM2	Diabetes mellitus type 2
Tregs	Regulatory T cells
HFD	High fat diet
F/B	Firmicutes to Bacteroidetes
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
BL	Bacillary load
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
SI	Single infection
MCI	Multiple consecutive infections
NI	Natural immunity
CFU	Colony-forming unit
ND	Normal diet
p.i.	Post-infection

OTU	Operational taxonomic unit
NMDS	<i>Non-metric multidimensional scaling</i>
MST	Median survival time

## 6. Funding

This work was supported by the European Commission Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement TBVAC2020 No. 643381, European Research Council research grant 638553-TB-ACCELERATE and Ministerio de Economía y Competitividad (Spanish government) research grant SAF2017-92345-EXP (to IC). CV has a project Servet II contract funded by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, CPII 18/00031). LA received an Improvement and Mobility Program grant from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). GAG contract was funded by Ministerio de Economía y Competitividad (Spanish Government) (BES-2014-071066). PC contract was funded by the Instituto de Salud Carlos III (IFI14/00015). GAG contract was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2014-071066). The Experimental Tuberculosis Unit is accredited by the Catalan Agency for Management of University and Research Grants with code 2017 SGR500 and the IGTP is a member of the CERCA network of institutes. The funders played no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## 7. Acknowledgements

We thank the IGTP Flow Cytometry Core Facility and staff for their contribution to this publication.

## 8. Author Contributions Statement

PJC led the project. CV, IC and PJC conceived and planned the experiments. LA, PC, JD, YR, GAG, MTP and EG carried out the experiments. LA, GAG, PC, IC, CV and PJC contributed to interpretation of the results. LA, CV and PJC took the lead in writing the manuscript. All authors contributed to drafting the work; and gave final approval for the version to be published. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

## 9. Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 10. References

1. WHO. Global strategy and targets for tuberculosis prevention , care and control after 2015. (2014)1–23. Available at: [http://www.who.int/tb/post2015%7B\\_%7DTBstrategy.pdf](http://www.who.int/tb/post2015%7B_%7DTBstrategy.pdf)
2. Narasimhan P, Wood J, Macintyre CR, Mathai D. Risk factors for tuberculosis. *Pulm Med* (2013) **2013**:828939. doi:10.1155/2013/828939
3. Cegielski JP, McMurray DN. The relationship between malnutrition and tuberculosis: Evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis* (2004) **8**:286–298.
4. Gupta K, Gupta R, Atreja A, Verma M, Vishvkarma S. Tuberculosis and nutrition. *Lung India* (2009) **26**:9. doi:10.4103/0970-2113.45198
5. Leung CC. Lower Risk of Tuberculosis in Obesity. *Arch Intern Med* (2007) **167**:1297. doi:10.1001/archinte.167.12.1297
6. Roth J, Sahota N. Obesity Paradox, Obesity Orthodox, and the Metabolic Syndrome: An Approach to Unity. *Mol Med* (2016) **22**:1. doi:10.2119/molmed.2016.00211
7. Brima W, Eden DJ, Mehdi SF, Bravo M, Wiese MM, Stein J, Almonte V, Zhao D, Kurland I, Pessin JE, et al. The brighter (and evolutionarily older) face of the metabolic syndrome: evidence from *Trypanosoma cruzi* infection in CD-1 mice. *Diabetes Metab Res Rev* (2015) **31**:346–359. doi:10.1002/dmrr.2636
8. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med* (2008) **5**:1091–1101. doi:10.1371/journal.pmed.0050152
9. Little M, Humphries S, Patel K, Dewey C. Decoding the Type 2 Diabetes Epidemic in Rural India. *Med Anthropol* (2017) **36**:96–110. doi:10.1080/01459740.2016.1231676
10. Manyema M, Veerman JL, Chola L, Tugendhaft A, Labadarios D, Hofman K. Decreasing the burden of type 2 diabetes in South Africa: The impact of taxing sugar-sweetened beverages. *PLoS One* (2015) **10**:1–17. doi:10.1371/journal.pone.0143050
11. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* (2006) **444**:860–867. doi:10.1038/nature05485
12. Hodgson K, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology* (2015) **144**:171–185. doi:10.1111/imm.12394
13. Lin H, An Y, Hao F, Wang Y, Tang H. Correlations of Fecal Metabonomic and Microbiomic Changes Induced by High-fat Diet in the Pre-Obesity State. *Sci Rep* (2016) **6**:1–14. doi:10.1038/srep21618
14. Rabot S, Membrez M, Blancher F, Berger B, Moine D, Krause L, Bibiloni R, Bruneau A, Gérard P, Siddharth J, et al. High fat diet drives obesity regardless the composition of gut microbiota in mice. *Sci Rep* (2016) **6**:1–11. doi:10.1038/srep32484

15. Winglee K, Eloie-Fadrosch E, Gupta S, Guo H, Fraser C, Bishai W. Aerosol mycobacterium tuberculosis infection causes rapid loss of diversity in gut microbiota. *PLoS One* (2014) **9**:1–9. doi:10.1371/journal.pone.0097048
16. Namasivayam S, Maiga M, Yuan W, Thovarai V, Costa DL, Mittereder LR, Wipperman MF, Glickman MS, Dzutsev A, Trinchieri G, et al. Longitudinal profiling reveals a persistent intestinal dysbiosis triggered by conventional anti-tuberculosis therapy. *Microbiome* (2017) **5**:71. doi:10.1186/s40168-017-0286-2
17. Wipperman MF, Fitzgerald DW, Juste MAJ, Taur Y, Namasivayam S, Sher A, Bean JM, Bucci V, Glickman MS. Antibiotic treatment for Tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed. *Sci Rep* (2017) **7**:1–11. doi:10.1038/s41598-017-10346-6
18. Kaakoush NO. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol* (2015) **5**:1–4. doi:10.3389/fcimb.2015.00084
19. Maji A, Misra R, Dhakan DB, Gupta V, Mahato NK, Saxena R, Mittal P, Thukral N, Sharma E, Singh A, et al. Gut microbiome contributes to impairment of immunity in pulmonary tuberculosis patients by alteration of butyrate and propionate producers. *Environ Microbiol* (2018) **20**:402–419. doi:10.1111/1462-2920.14015
20. Cardona PJ. The key role of exudative lesions and their encapsulation: Lessons learned from the pathology of human pulmonary tuberculosis. *Front Microbiol* (2015) **6**:1–8. doi:10.3389/fmicb.2015.00612
21. Cardona PJ, Vilaplana C. Multiple consecutive infections might explain the lack of protection by BCG. *PLoS One* (2014) **9**: doi:10.1371/journal.pone.0094736
22. Kamath AB, Behar SM. Anamnestic Responses of Mice following. *Society* (2005) **73**:6110–6118. doi:10.1128/IAI.73.9.6110
23. Cooper AM, Callahan JE, Keen M, Belisle JT, Orme IM. Expression of memory immunity in the lung following re-exposure to Mycobacterium tuberculosis. *Tuber Lung Dis* (1997) **78**:67–73. doi:10.1016/S0962-8479(97)90017-4
24. Orme IM. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* (1988) **140**:3589–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3129497> [Accessed September 3, 2019]
25. Algoblan A, Alalfi M, Khan M. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* (2014) **7**:587. doi:10.2147/DMSO.S67400
26. Marzo E, Vilaplana C, Tapia G, Diaz J, Garcia V, Cardona P-J. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis* (2014) **94**:55–64. doi:10.1016/J.TUBE.2013.09.004
27. Gil O, Díaz I, Vilaplana C, Tapia G, Díaz J, Fort M, Cáceres N, Pinto S, Caylà J, Corner L, et al. Granuloma encapsulation is a key factor for containing

- tuberculosis infection in minipigs. *PLoS One* (2010) **5**: doi:10.1371/journal.pone.0010030
28. Gil O, Guirado E, Gordillo S, Díaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ariza A, Ausina V, Cardona PJ. Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis* is related to bacterial load rather than to any one cytokine or T cell type. *Microbes Infect* (2006) **8**:628–636. doi:10.1016/j.micinf.2005.08.014
  29. Dalby MJ, Ross AW, Walker AW, Morgan PJ. Dietary Uncoupling of Gut Microbiota and Energy Harvesting from Obesity and Glucose Tolerance in Mice. *Cell Rep* (2017) **21**:1521–1533. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.056
  30. Rosshart SP, Vassallo BG, Angeletti D, Hutchinson DS, Morgan AP, Takeda K, Hickman HD, McCulloch JA, Badger JH, Ajami NJ, et al. Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell* (2017) **171**:1015–1028.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.09.016
  31. Wipperfurth MF, Fitzgerald DW, Juste MAJ, Taur Y, Namasivayam S, Sher A, Bean JM, Bucci V, Glickman MS. Antibiotic treatment for Tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed. *Sci Rep* (2017) **7**:1–11. doi:10.1038/s41598-017-10346-6
  32. Ordway DJ, Shang S, Henao-Tamayo M, Obregon-Henao A, Nold L, Caraway M, Shanley CA, Basaraba RJ, Duncan CG, Orme IM. *Mycobacterium bovis* BCG-mediated protection against W-Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* is diminished concomitant with the emergence of regulatory T cells. *Clin Vaccine Immunol* (2011) **18**:1527–1535. doi:10.1128/CVI.05127-11
  33. Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, Barry C, Kaplan G. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing Strains Upregulate Type I IFNs and Increase Expression of Negative Regulators of the Jak-Stat Pathway. *J Interf Cytokine Res* (2005) **25**:694–701. doi:10.1089/jir.2005.25.694
  34. Dutta NK, Illei PB, Jain SK, Karakousis PC. Characterization of a novel necrotic granuloma model of latent tuberculosis infection and reactivation in mice. *Am J Pathol* (2014) **184**:2045–2055. doi:10.1016/j.ajpath.2014.03.008
  35. Irwin SM, Driver E, Lyon E, Schrupp C, Ryan G, Gonzalez-Juarrero M, Basaraba RJ, Nuermberger EL, Lenaerts AJ. Presence of multiple lesion types with vastly different microenvironments in C3HeB/FeJ mice following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Dis Model Mech* (2015) **8**:591–602. doi:10.1242/dmm.019570
  36. Dalby MJ, Ross AW, Walker AW, Morgan PJ. Dietary Uncoupling of Gut Microbiota and Energy Harvesting from Obesity and Glucose Tolerance in Mice. *Cell Rep* (2017) **21**:1521–1533. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.056
  37. Cegielski JP, Arab L, Cornoni-Huntley J. Nutritional risk factors for tuberculosis among adults in the United States, 1971–1992. *Am J Epidemiol* (2012) **176**:409–422. doi:10.1093/aje/kws007
  38. Ley R, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Microbial ecology: human gut



- microbes associated with obesity. *Nature* (2006) **444**:1022–3. doi:10.1038/nature4441021a
39. Zheng H, Chen M, Li Y, Wang Y, Wei L, Liao Z, Wang M, Ma F, Liao Q, Xie Z. Modulation of gut microbiome composition and function in experimental colitis treated with sulfasalazine. *Front Microbiol* (2017) **8**:1–15. doi:10.3389/fmicb.2017.01703
  40. Cong Y, Feng T, Fujihashi K, Schoeb TR, Elson CO. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci* (2009) **106**:19256–19261. doi:10.1073/pnas.0812681106
  41. Zhao Q, Elson CO. Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology* (2018) **154**:28–37. doi:10.1111/imm.12896
  42. Li S, Wang Z, Yang Y, Yang S, Yao C, Liu K, Cui S, Zou Q, Sun H, Guo G. Lachnospiraceae shift in the microbial community of mice faecal sample effects on water immersion restraint stress. *AMB Express* (2017) **7**: doi:10.1186/s13568-017-0383-4
  43. Liu X, Zeng B, Zhang J, Li W, Mou F, Wang H, Zou Q, Zhong B, Wu L, Wei H, et al. Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice. *Sci Rep* (2016) **6**:1–11. doi:10.1038/srep30594
  44. Kim E, Kim DB, Park JY. Changes of mouse gut microbiota diversity and composition by modulating dietary protein and carbohydrate contents: A pilot study. *Prev Nutr Food Sci* (2016) **21**:57–61. doi:10.3746/pnf.2016.21.1.57
  45. Liu T, Hougen H, Vollmer AC, Hiebert SM. Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids. *Anaerobe* (2012) **18**:331–337. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.02.004
  46. Costello ME, Ciccio F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, Marshall M, Kenna TJ, Triolo G, Brown MA. Brief Report: Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol* (2015) **67**:686–691. doi:10.1002/art.38967
  47. Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, Lipuma L, Ling L, Gobourne A, No D, et al. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun* (2013) **81**:965–973. doi:10.1128/IAI.01197-12
  48. Langille MGI, Meehan CJ, Koenig JE, Dhanani AS, Rose RA, Howlett SE, Beiko RG. Microbial shifts in the aging mouse gut. *Microbiome* (2014) **2**:1–12. doi:10.1186/s40168-014-0050-9
  49. Zhang C, Zhang M, Pang X, Zhao Y, Wang L, Zhao L. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J* (2012) **6**:1848–1857. doi:10.1038/ismej.2012.27
  50. Chiodini RJ, Dowd SE, Chamberlin WM, Galandiuk S, Davis B, Glassing A. Microbial population differentials between mucosal and submucosal intestinal tissues in advanced Crohn’s disease of the ileum. *PLoS One* (2015) **10**:1–19. doi:10.1371/journal.pone.0134382
  51. Huang C, Chen J, Wang J, Zhou H, Lu Y, Lou L, Zheng J, Tian L, Wang X, Cao Z, et al. Dysbiosis of intestinal microbiota and decreased antimicrobial

- peptide level in paneth cells during hypertriglyceridemia-related acute necrotizing pancreatitis in rats. *Front Microbiol* (2017) **8**:1–13. doi:10.3389/fmicb.2017.00776
52. Million M, Tomas J, Wagner C, Lelouard H, Raoult D, Gorvel JP. New insights in gut microbiota and mucosal immunity of the small intestine. *Hum Microbiome J* (2018) **7–8**:23–32. doi:10.1016/j.humic.2018.01.004
53. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* (2017) **23**:107–113. doi:10.1038/nm.4236
54. Loy A, Pfann C, Steinberger M, Hanson B, Herp S, Brugiroux S, Gomes C, Boekschoten M V., Schwab C, Urich T, et al. *schaedleri*, a Core Member of the Murine Gut Microbiota. *mSystems* (2017) **2**:e00171-16. doi:10.1128/mSystems.00171-16
55. Zelmer A, Stockdale L, Prabowo SA, Cia F, Spink N, Gibb M, Eddaoudi A, Fletcher HA. High monocyte to lymphocyte ratio is associated with impaired protection after subcutaneous administration of BCG in a mouse model of tuberculosis. *F1000Research* (2018) **7**:296. doi:10.12688/f1000research.14239.1
56. Tzelepis F, Blagih J, Khan N, Gillard J, Mendonca L, Roy DG, Ma EH, Joubert P, Jones RG, Divangahi M. Mitochondrial cyclophilin D regulates T cell metabolic responses and disease tolerance to tuberculosis. *Sci Immunol* (2018) **3**:ear4135. doi:10.1126/sciimmunol.aar4135

## 11. Tables

**Table 1.** Experimental design of both experiments performed in the study  
-w12: twelve weeks before challenge; w3, w4, w16: three, four and sixteen weeks post-challenge.

Experimental design							
Experiment 1	Time of infection	-w12	w0	w3	w4	w16	w16→
	Time of diet	w0	w12	w15	w16	w28	w28→
		BCG	Infection	Euthanasia (n=5)	Euthanasia (n=5)	Euthanasia (n=10)	Survival (n=10)
Experiment 2	Time of infection	-w12	-w10 to w0	w0	w0→		
	Time of diet	w0	w2 to w10	w12	w12→		
		Single infection	Antibiotic treatment	Infection	Survival (n=10)		

**Table 2.** Experimental groups and conditions tested per experiment

Experiment 1				Experiment 2			
Group	Experimental conditions			Group	Experimental conditions		
	Obesity	BCG	Type of infection		Obesity	Protection	Type of infection
ND-SI	NO	NO	SI	ND-NI	NO	NI	MCI
ND-MCI	NO	NO	MCI	HFD-NI	YES	NI	MCI
ND-BCG-SI	NO	YES	SI				
ND-BCG-MCI	NO	YES	MCI				
HFD-SI	YES	NO	SI				
HFD-MCI	YES	NO	MCI				
HFD-BCG-SI	YES	YES	SI				
HFD-BCG-MCI	YES	YES	MCI				

**Table 3.** P-value summary of three-way ANOVA from cytokines quantified in lungs (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Source of variation	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-6	IL-10	IL-12	CXCL5	IL-17	CXCL1	TNF- $\alpha$	TGF- $\beta$
Infection	****	ns	****	**	****	*	****	****	****	ns
Diet	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BCG	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
Infection x Diet	***	ns	ns	ns	ns	**	*	*	**	ns
Infection x BCG	**	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns
Diet x BCG	*	****	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns
Infection x Diet x BCG	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

## 12. Figure legends

**Figure 1.** Weight evolution during the experiment in pre- and post-infection status. Weight evolution of the same experiment is represented by comparing ND and HFD (A-F) and Sham and BCG (G-L). Panels represent: pre-infection and sham (A), SI and sham (B), MCI and sham (C), pre-infection and BCG (D), SI and BCG (E), MCI and BCG (F), pre-infection and ND (G), SI and ND (H), MCI and ND (I), pre-infection and HFD (J), SI and HFD (K), MCI and HFD (L). Linear regression are represented together with  $p$ -values. Slopes' values are included in Supplementary Table S1

**Figure 2.** Bacillary load progression at different end time points (w3, w4 and w16) are shown as log CFUs/ml. Each panel compares sham and BCG vaccinated groups: ND and SI (**A**), ND and MCI (**B**), HFD and SI (**C**), HFD and MCI (**D**). Box and whiskers plots show the minimum, first quartile, median, third quartile and maximum values. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Mann–Whitney test.

**Figure 3.** Progression of lung disease at different end time points (w3, w4 and w16) is shown as the percentage of damaged area. Each panel compares sham and BCG vaccinated groups: ND and SI (**A**), ND and MCI (**B**), HFD and SI (**C**), HFD and MCI (**D**). Bar plots show median with range. \* $p < 0.05$ ; Mann–Whitney test.

**Figure 4.** Quality of the lesions found at week 16 post-infection. The tissue sections show a proliferative (**A**) and an exudative (**B**) lesion stained with H/E. (**C**) Relative percentage of exudative lesions at week 16. Black bars represent ND groups while red bars represent HFD groups. Hatched bars in each type of diet represent vaccination. Bar plots show median with range. Asterisk indicates differences between vaccination and infection in each diet; hashtag indicates differences between diets. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.05$ ; Mann–Whitney test.

**Figure 5.** Principal component analysis of inflammatory mediators. (**A**) Representation of animals according to experimental groups with 95% confidence ellipses. (**B**) Samples colored by type of infection.

**Figure 6.** Evolution of survival after *Mtb* infection for the first experiment. Each panel compares sham and BCG vaccinated groups: ND and SI (**A**), ND and MCI (**B**), HFD and SI (**C**), HFD and MCI (**D**). Median survival times and  $p$ -values are indicated in each panel. Log-rank test.

**Figure 7.** Evolution of survival after *Mtb* infection for the second experiment. Each panel compares sham and NI groups: ND (**A**) and HFD (**B**). Median survival times and  $p$ -values are indicated in each panel. Log-rank test.

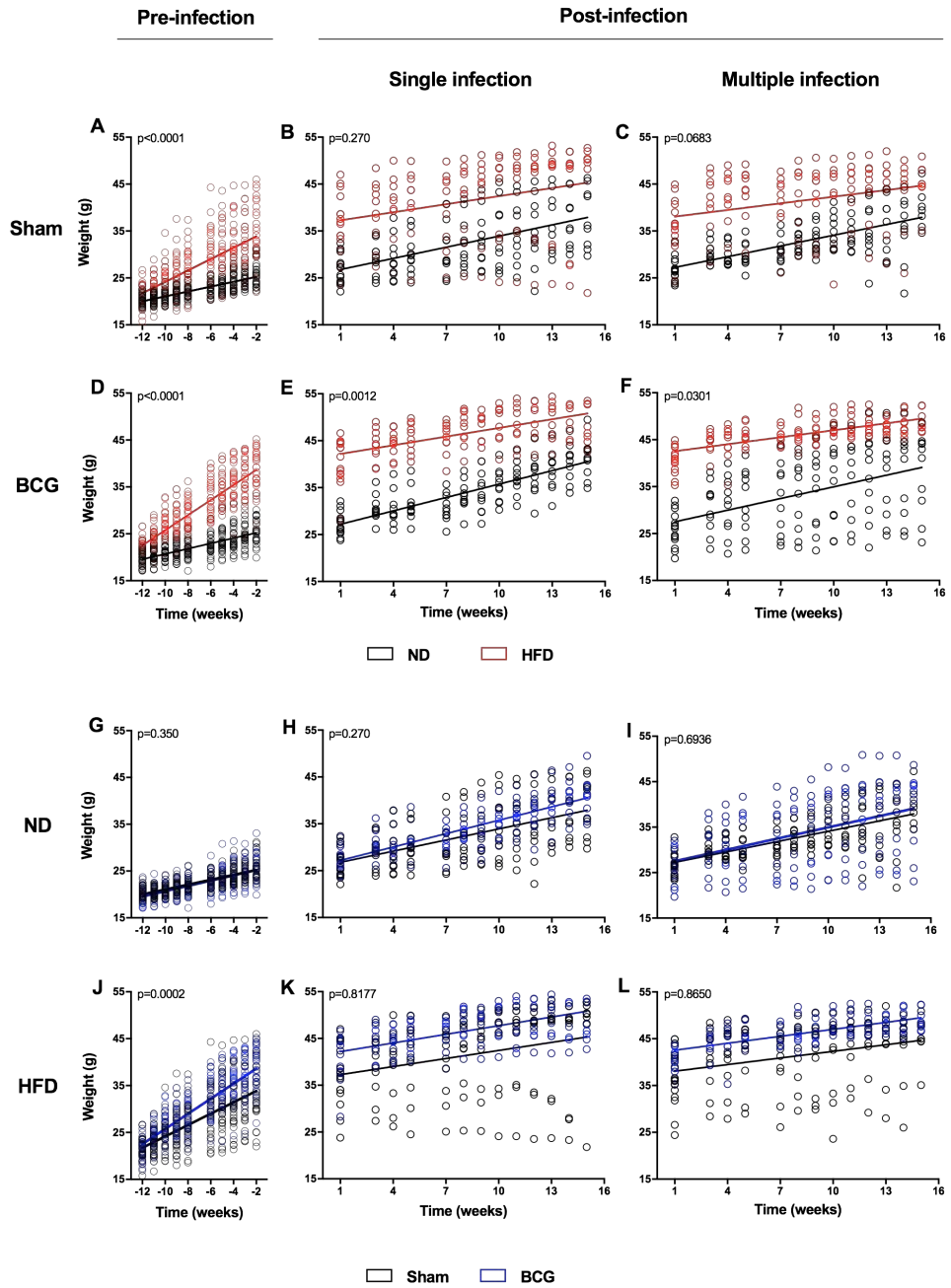
**Figure 8.** Analysis of the microbiota diversity based on 16S rRNA sequencing. In each panel the ND group is colored in black and the HFD group in red. Rarefaction curves at week 16 (**A**) and week 28 (**B**) after starting the different diets are represented. (**C**) NMDS ordination in samples following different diets. (**D**) Shannon, Simpson and Inverse Simpson diversity indexes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Mann–Whitney test.

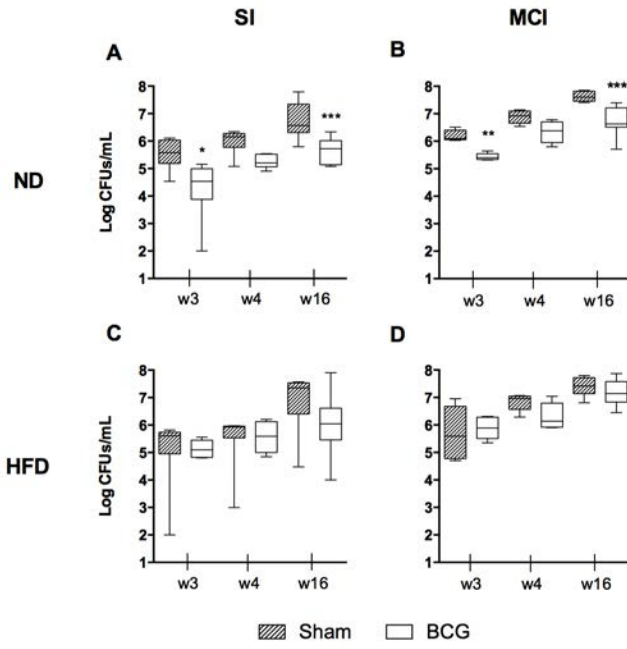
**Figure 9.** Taxonomic composition of the intestinal microbiota based on 16S rRNA sequencing at week 16 after starting both diets. Analysis of the relative abundance of the most abundant phylum (**A**), class (**B**), order (**C**), family (**D**) and genus (**E**) in ND

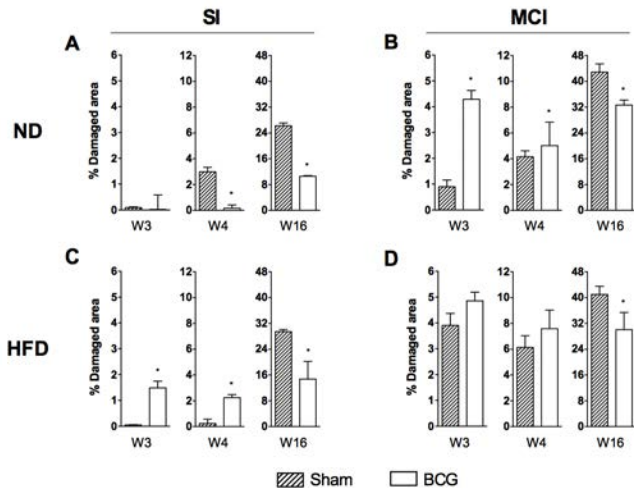
versus HFD. **(F)** Bar plot representation of the OTUs of each sample according the taxonomic classification. **(G)** Regression plot of Firmicutes and Bacteroidetes phyla against animal weight and analysis of the F/B ratio in ND and HFD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Mann–Whitney test.

**Figure 10.** Taxonomic composition of the intestinal microbiota based on 16S rRNA sequencing at week 28 after starting both diets. Analysis of the relative abundance of the most abundant phylum **(A)**, class **(B)**, order **(C)**, family **(D)** and genus **(E)** in ND versus HFD. **(F)** Bar plot representation of the OTUs of each sample according the taxonomic classification. **(G)** Regression plot of Firmicutes and Bacteroidetes phyla against animal weight and analysis of the F/B ratio in ND and HFD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Mann–Whitney test.

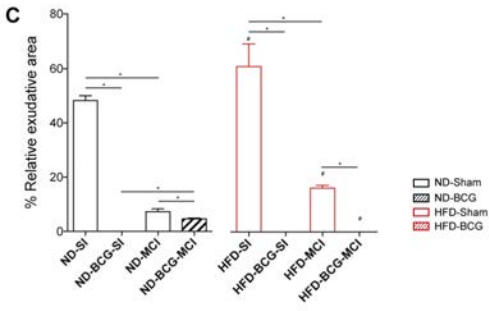
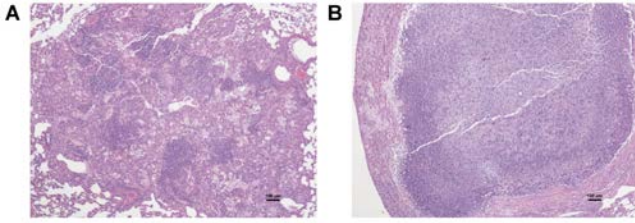
**Figure 11.** Taxonomic composition of the intestinal microbiota based on 16S rRNA sequencing between different diets and under chemotherapy. Analysis of the relative abundance of the most abundant phylum **(A)**, class **(B)**, order **(C)**, family **(D)** and genus **(E)**. **(F)** Bar plot representation of the OTUs of each sample according the taxonomic classification. **(G)** Analysis of the F/B ratio. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Mann–Whitney test.

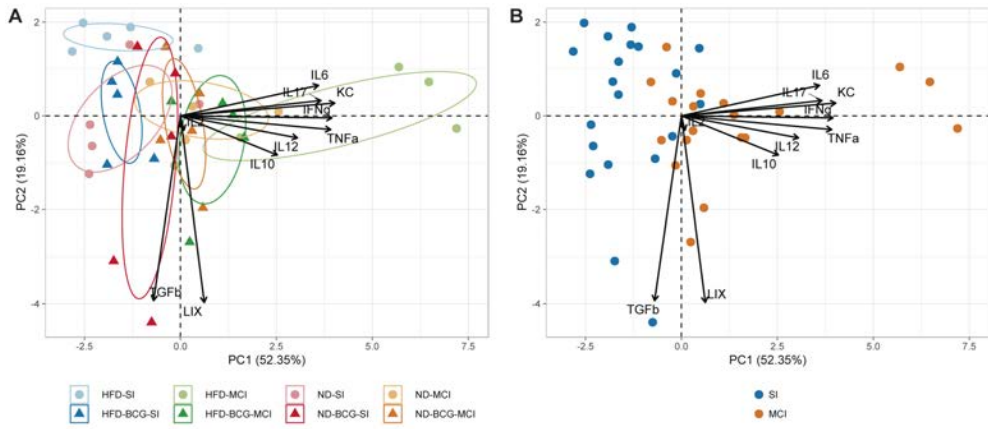


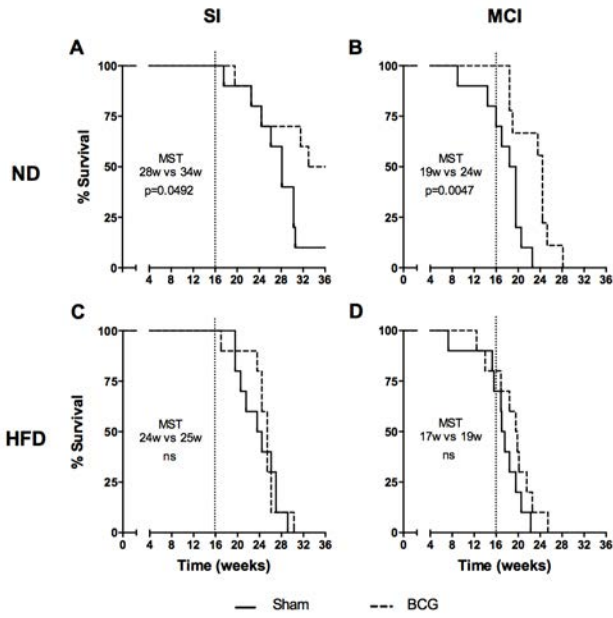


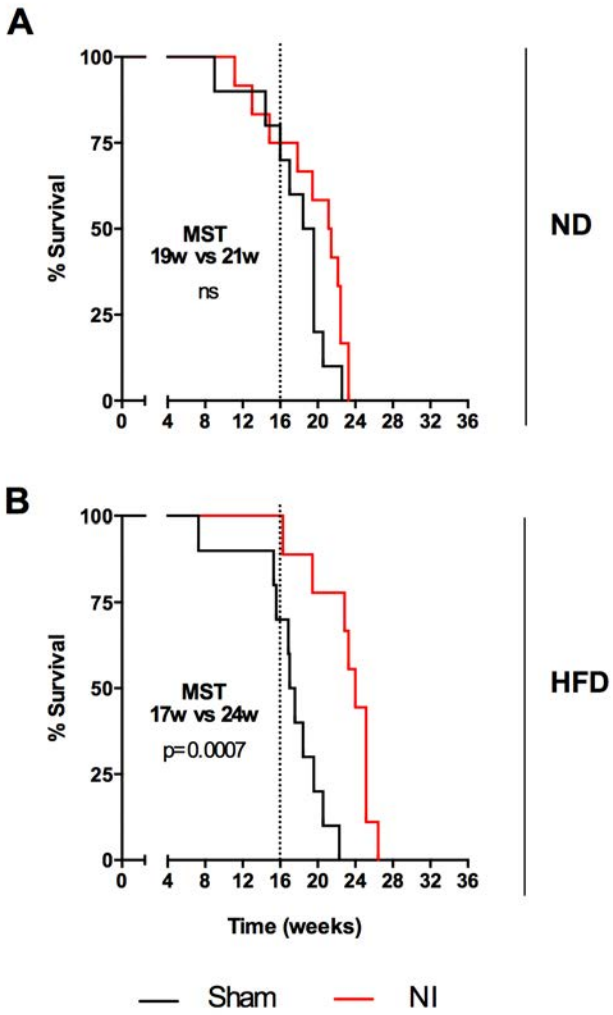


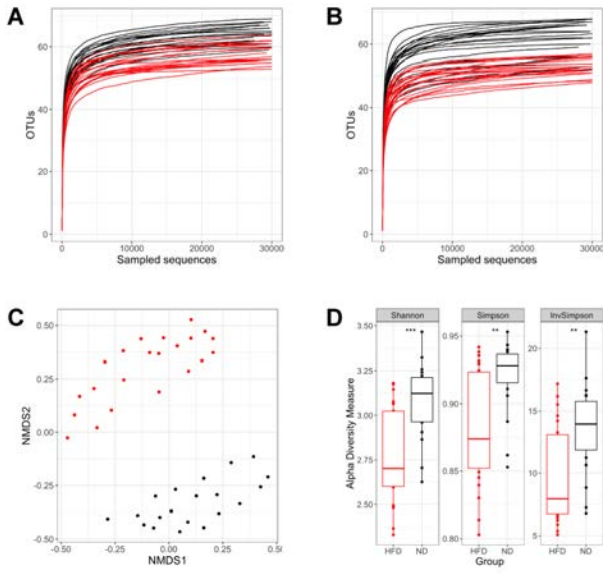


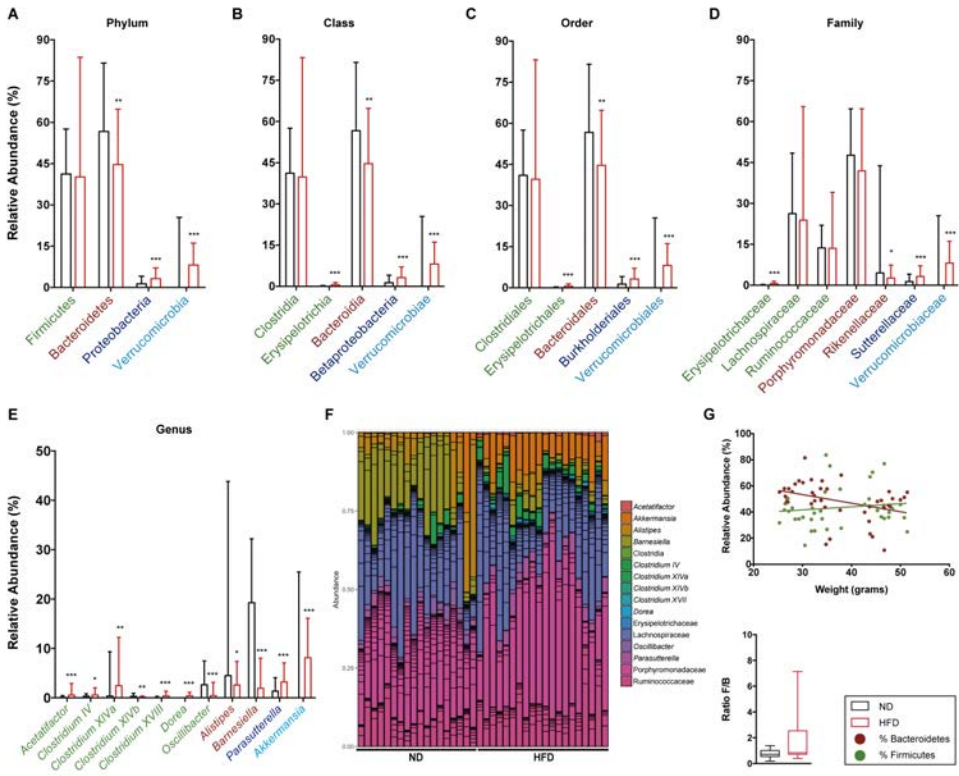


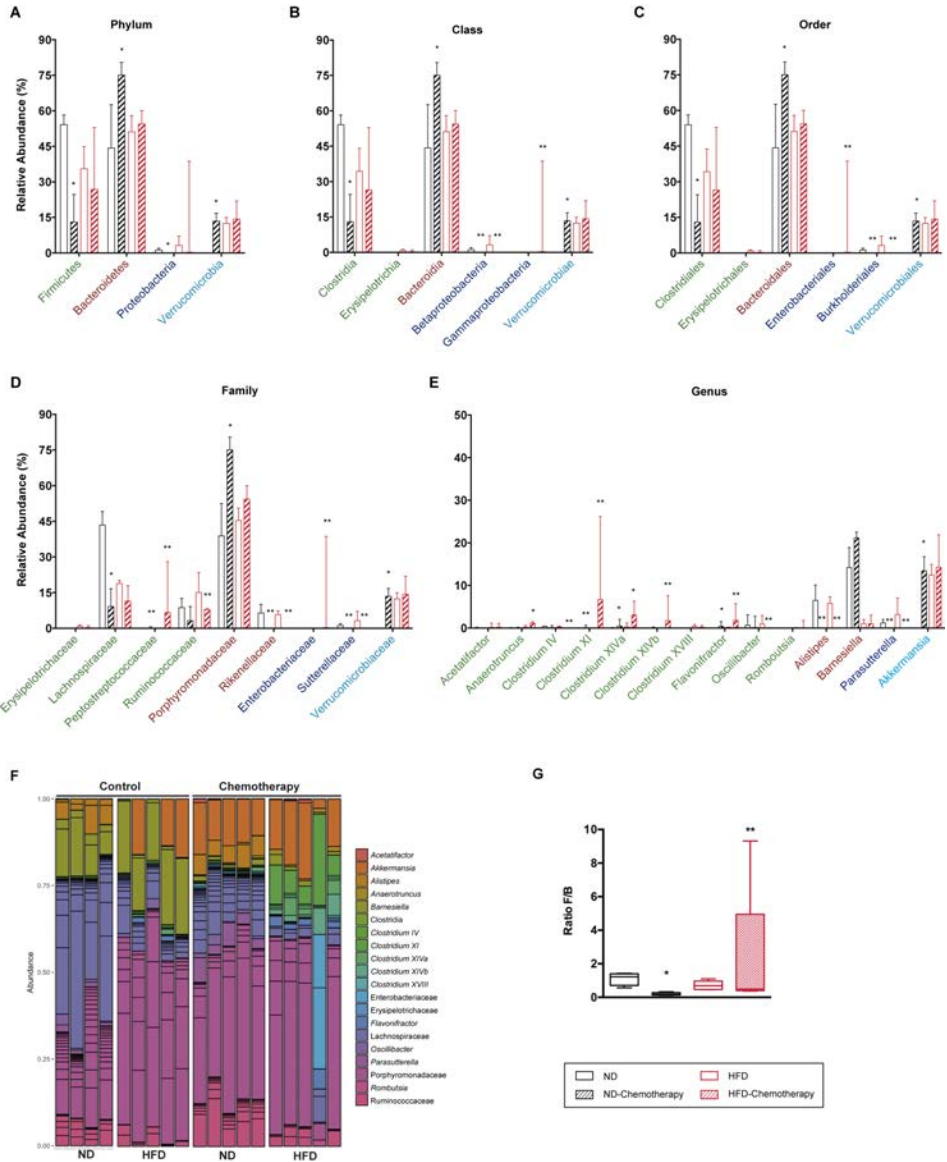












*Supplementary Material*

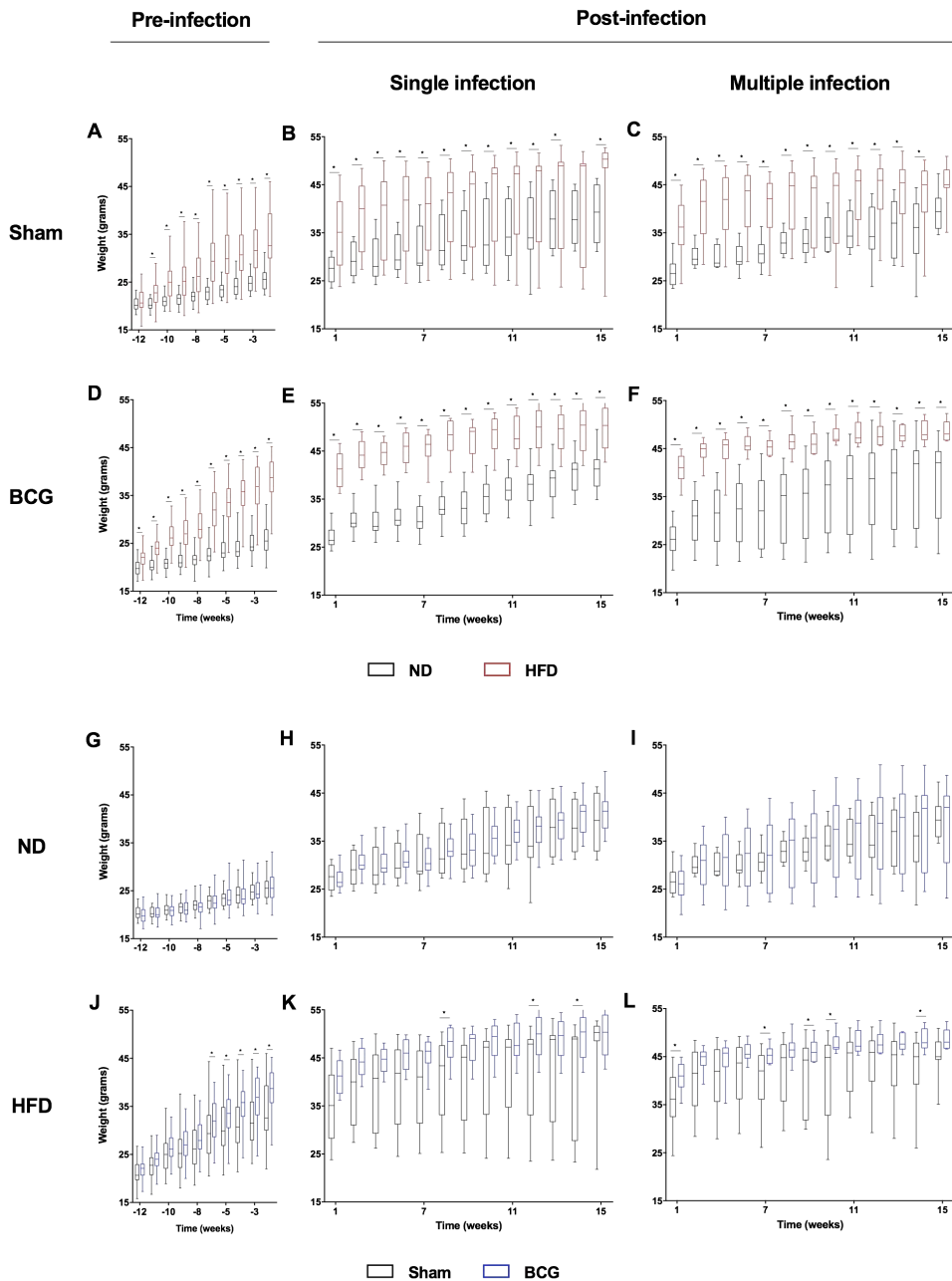
**High Fat Diet-Induced Obesity accelerates the progression to tuberculosis in C3HeB/FeJ Mice. Influence of the gut microbiota**

**Lilibeth Arias, Galo Adrián Goig, Paula Cardona, Manuela Torres-Puente, Jorge Díaz, Yaiza Rosales, Eric Garcia, Gustavo Tapia, Iñaki Comas, Cristina Vilaplana, Pere-Joan Cardona\*.**

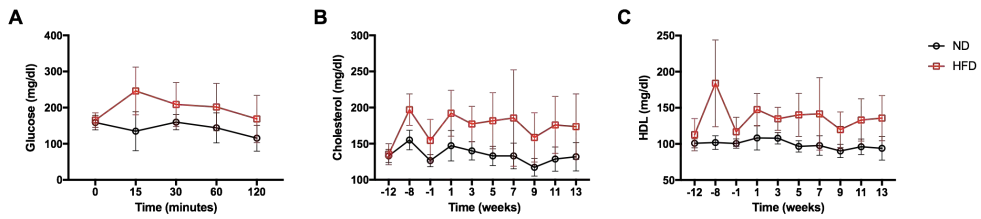
\* Correspondence: Pere-Joan Cardona: [pj.cardona@gmail.com](mailto:pj.cardona@gmail.com)

1. **Supplementary Figures and Tables**
  - 1.1. **Figures**

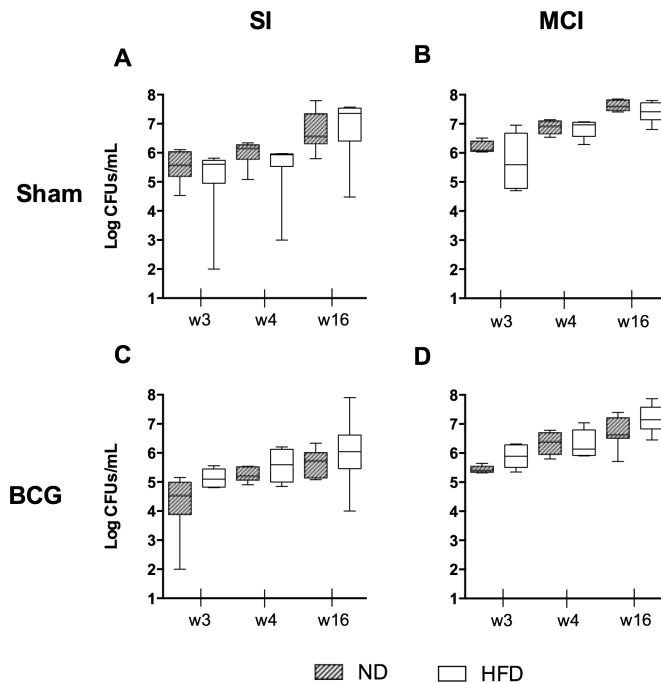




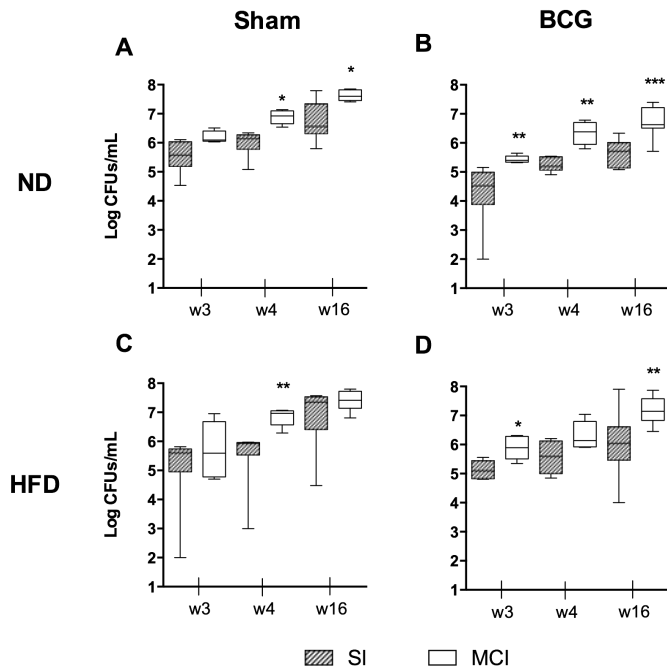
**Figure S1.** Box and whiskers plots showing weight evolution during the experiment in pre- and post-infection status. Weight evolution is represented by comparing ND and HFD (A-F) and Sham and BCG (G-L). Panels represent: pre-infection and sham (A), SI and sham (B), MCI and sham (C), pre-infection and BCG (D), SI and BCG (E), MCI and BCG (F), pre-infection and ND (G), SI and ND (H), MCI and ND (I), pre-infection and HFD (J), SI and HFD (K), MCI and HFD (L). Mann-Whitney test.



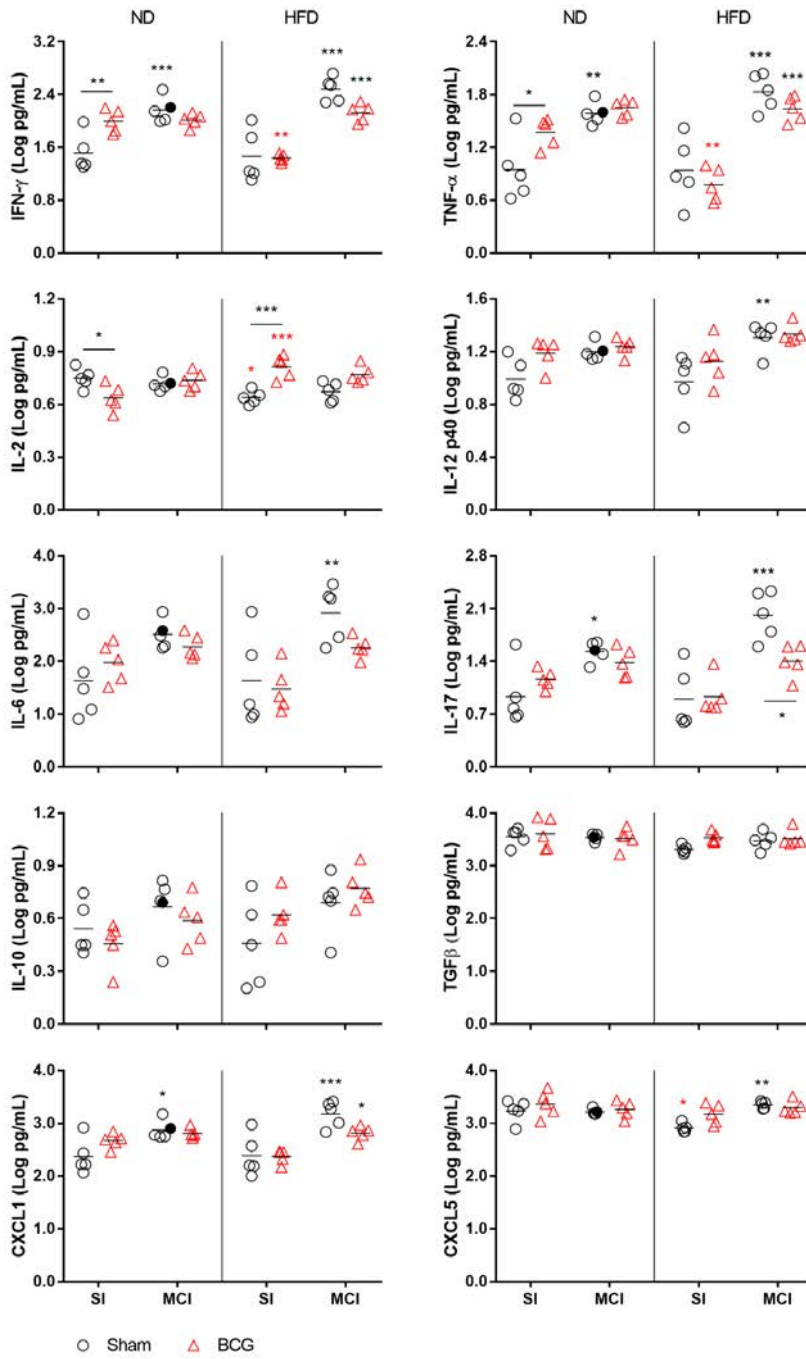
**Figure S2.** Glucose tolerance test (A), cholesterol (B) and HDL (C) in mice given a high fat diet or a normal diet. For glucose tolerance test  $n=6$  animals per group were included. For cholesterol and HDL determination  $n=18$  mice per group were included at each time point. Two way ANOVA test was performed to test diet influence. Diet affects glucose tolerance ( $p=0.0178$ ), cholesterol ( $p<0.0001$ ) and HDL concentrations ( $p<0.0001$ ).



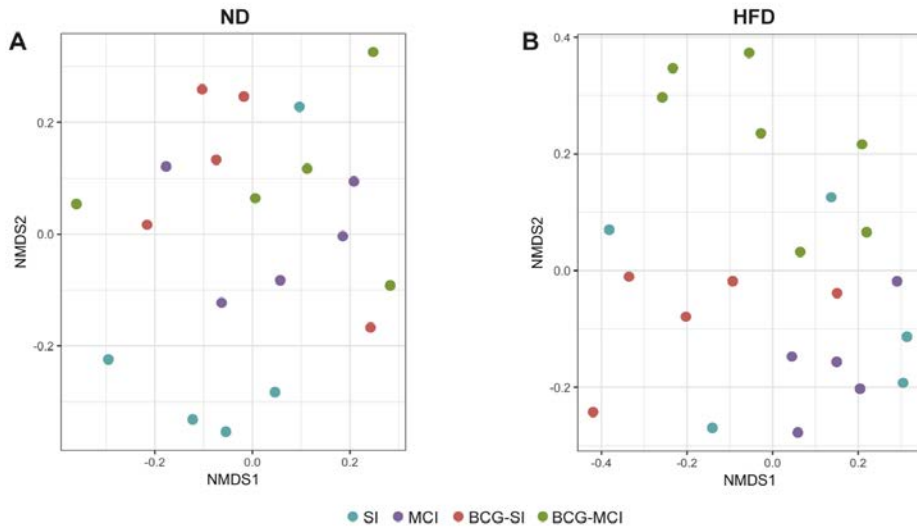
**Figure S3.** Bacillary load progression at different end time points (w3, w4 and w16) are shown as log CFUs/ml. Each panel compares ND and HFD groups: sham and SI (A), sham and MCI (B), BCG and SI (C), BCG and MCI (D). Box and whiskers plots show the minimum, first quartile, median, third quartile and maximum values. Mann–Whitney test.



**Figure S4.** Bacillary load progression at different end time points (w3, w4 and w16) are shown as log CFUs/ml. Each panel compares SI and MCI groups: ND and sham (A), ND and BCG (B), HFD and sham (C), HFD and BCG (D). Box and whiskers plots show the minimum, first quartile, median, third quartile and maximum values. Mann–Whitney test.



**Figure S5.** Analysis of inflammatory mediators in lung homogenates at w4 post-infection. Results are represented as Log10 of the concentration in pg/ml. Comparisons are differently indicated depending on the experimental condition tested: line and asterisks (vaccination), black asterisks (infection), red asterisks (diet). Holm Sidak's multiple comparisons test.



**Figure S6.** Analysis of the microbiota diversity based on 16S rRNA sequencing. NMDS ordination was performed separately in each type of diet: ND (A) and HFD (B).

## 1.1. Tables

**Table S1.** Comparisons of the pre-infection and post-infection weight increase slopes and their corresponding *p*-values obtained with linear regression test showed in Figure 1

Experimental groups		Slope	p-value	
PRE-INFECTION	Diet	ND	0.521	
		HFD	1.213	
		ND-BCG	0.565	
		HFD-BCG	1.61	
	Vaccination	ND	0.521	0.350
		ND-BCG	0.565	
		HFD	1.213	0.0002
		HFD-BCG	1.61	
POST-INFECTION	Diet	ND-SI	0.793	0.270
		HFD-SI	0.574	
		ND-MCI	0.762	0.0683
		HFD-MCI	0.472	
		ND-BCG-SI	0.952	0.0012
		HFD-BCG-SI	0.616	
		ND-BCG-MCI	0.828	0.0301
		HFD-BCG-MCI	0.496	
	Vaccination	ND-SI	0.793	0.270
		ND-BCG-SI	0.952	
		ND-MCI	0.762	0.6936
		ND-BCG-MCI	0.828	
		HFD-SI	0.574	0.8177
		HFD-BCG-SI	0.616	
		HFD-MCI	0.472	0.8650
		HFD-BCG-MCI	0.496	