



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Plasticidade dos neutrófilos durante a
infecção por *Mycobacterium tuberculosis*
está relacionada com a progressão da
doença humana**

Priscilla Mariane Cardoso Silva

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Plasticidade dos neutrófilos durante a infecção por
Mycobacterium tuberculosis está relacionada com a
progressão da doença humana**

Dissertação de mestrado apresentada ao
programa de Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientado(a): Priscilla Mariane Cardoso
Silva

Orientador(a): Profa. Dra. Fabiani Gai
Frantz

Ribeirão Preto
2017

CARDOSO-SILVA,
P. M.

Plasticidade de neutrófilos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* está relacionada a progressão da doença humana.

Espaço de
2,5 cm
reservado
para etiqueta
de
localização
da biblioteca

MESTRADO
2017
FCFRP-USP

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cardoso-Silva, Priscilla Mariane

Plasticidade dos neutrófilos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* está relacionada com a progressão da doença humana. Ribeirão Preto, 2017.

99p.: il.; 30cm

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Frantz, Fabiani Gai.

1. Neutrófilos. 2. *Mycobacterium tuberculosis* 3. Plasticidade 4. Tuberculose

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Priscilla Mariane Cardoso Silva

Título do Trabalho: Plasticidade dos neutrófilos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* está relacionada com a progressão da doença humana

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado(a): Priscilla Mariane Cardoso Silva

Orientador(a): **Profa. Dra.** Fabiani Gai Frantz

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimientos

À minha orientadora Dr(a) Fabiani Gai Frantz pela confiança, pela oportunidade e pela orientação. Muito obrigada por sempre se dispor a dividir comigo seus conhecimentos e me ensinar pacientemente muito sobre a vida e a pesquisa científica. Você é um lindo exemplo de mulher na ciência.

Aos meus pais Jorgina e Lázaro e a minha irmã Victória por me acompanharem desde o início nessa trajetória que escolhi, me apoiando e incentivando, sempre com uma grande atenção e amor. Vocês são inspiração para a minha vida.

Ao meu marido Lucas Calixto por acreditar tanto em mim, por me acompanhar em cada passo. Obrigada por não cansar de me ouvir e estar sempre disposto a me ajudar. Juntos construímos sonhos, e traçamos sempre um caminho.

À Fabiana Albani Zambuzi esse agradecimento é fácil, se resume a: sem você seria impossível. Nunca vou conseguir agradecer o suficiente todo o apoio, a ajuda nos experimentos, as trocas, as discussões, as conversas, a paciência, o carinho e a amizade. Durante esse caminho nos unimos, nos ajudamos e nos fortalecemos diante todos os momentos difíceis. Aprendi muito com você, Fabi, e tenho certeza que o seu futuro será brilhante.

À Luana e Verônica por sempre discutir comigo as dúvidas durante esse mestrado e por sempre me ajudar a ultrapassar os obstáculos. A amizade de vocês foi muito importante durante esse processo. Não muito longe, do outro lado da porta, eu também podia sempre contar com a amizade e apoio de vocês, Morgana, Mouzarlem e Karina, muito obrigada.

Aos amigos do LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética), Leonardo, Caroline e Ricardo, obrigada por me acolherem tão bem e pela experiência maravilhosa que foi trabalhar com vocês.

Às minhas amigas Iza, Aninha e Wendy, vocês estão comigo desde o meu primeiro IC, vocês que me ajudaram a entender um laboratório e a amá-lo mesmo quando tudo vai errado. A tranquilidade e a perseverança de vocês me mostraram que os problemas são pequenos e que com dedicação tudo acaba bem.

Aos amigos do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) Mirela, Gisele, Alyne, Carlos, Luma, Luana, Marcela, Pericles, Priscilla, Ana Paula pela amizade e pela convivência.

Aos amigos que a USP me deu e àqueles que Ribeirão Preto me apresentou com tanto amor. Obrigada por serem um refúgio nos momentos difíceis.

À professora Dr(a) Lúcia Helena Faccioli por compartilhar da estrutura do seu laboratório.

Ao professor Dr. Valdes Bollela pela parceria no desenvolvimento desse projeto, auxiliando no contato com os pacientes e com a avaliação clínica.

À Equipe do Hospital das Clínicas, do Centro de Saúde Escola e da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas todos sempre contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Aos voluntários, aos pacientes, à todos que doaram um pouco do seu sangue para a realização desse trabalho, o meu muito obrigada. Sem o auxílio de vocês nada seria possível.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, ao programa de pós-graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia.

Ao CNPq e à FAPESP (Processo 2011/12199-0) pelo suporte financeiro durante desenvolvimento do projeto.

RESUMO

CARDOSO-SILVA, P. M. **Plasticidade de neutrófilos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* está relacionada a progressão da doença humana**. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A tuberculose é uma doença infecciosa, causada pela *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que afeta um terço da população mundial, sendo que o hospedeiro infectado pode desenvolver tanto a forma ativa quanto latente da infecção. Juntamente com os macrófagos residentes, os neutrófilos parecem ser importantes no controle da infecção por Mtb e formação de granulomas no pulmão. Recentemente, alguns estudos estão quebrando paradigmas sobre os neutrófilos, revelando que em algumas situações como em câncer, essas células podem ser polarizadas para os perfis N1 e N2, associados respectivamente às respostas anti-tumoral e pró-tumoral. Estas descobertas abriram uma perspectiva diferente no estudo de infecções, inclusive na tuberculose. Assim, a hipótese deste trabalho é que a polarização dos neutrófilos nos perfis N1 e N2 pode influenciar o controle da infecção por Mtb, e portanto nosso objetivo foi avaliar como estes diferentes perfis estão relacionados com a patogênese da doença humana. Os neutrófilos foram isolados a partir de sangue periférico de 17 voluntários que não apresentavam a infecção ativa por Mtb. Estas células foram polarizadas *in vitro* com GM-CSF + IFN- γ para diferenciação no perfil N1 ou com IL-4 + IL-13 + TGF- β para diferenciação no perfil N2. Os neutrófilos polarizados foram caracterizados por análise morfológica, produção de espécies reativas de oxigênio e expressão gênica. Neutrófilos N1 e N2 foram então infectados *in vitro* por Mtb e a capacidade fagocítica e microbicida, bem como a liberação de NETs e a produção de citocinas foram analisadas. Os neutrófilos de pacientes com tuberculose ativa foram avaliados quanto a expressão de genes correlacionados aos perfis N1 e N2 e estabelecidas correlações com a gravidade da doença. Quando os neutrófilos foram desafiados com Mtb, o perfil N1 apresenta aumento de IL-8, IL-1- β , IFN- γ e a formação de NETs. Em contraste, o perfil de N2 apresentou menor produção destas citocinas inflamatórias, mas de forma evidente, aumento de IL-4 e TGF- β . Além disso, na condição N2 não foi possível observar a formação de NETs. Curiosamente, avaliando a atividade microbicida, quando os neutrófilos são polarizados, infectados por Mtb e co-cultivados com PBMC, os mediadores liberados por N1 e N2 potencializam a capacidade dos monócitos em eliminar a micobactéria. Adicionalmente, neutrófilos de 19 pacientes com tuberculose ativa foram avaliados quanto a expressão gênica, e comparadas à expressão dos neutrófilos de indivíduos não infectados. A expressão dos genes TLR4, LCN2 e Dectin1 estava diminuída em neutrófilos de pacientes com tuberculose e expressão do gene CCR7 foi correlacionada negativamente com a progressão da tuberculose, de modo que a maior expressão de CCR7 está relacionada à menor gravidade da doença. A expressão gênica também mostrou diferenças no perfil dos neutrófilos durante as distintas fases de ativação por Mtb. Este resultado reforça a ideia de plasticidade dos neutrófilos de acordo com o microambiente e ajuda a entender melhor como os subtipos de neutrófilos podem ter diferentes ações contra Mtb. Além disso, indica que os N2 estão mais relacionados com a doença na sua fase mais grave, impedindo a resolução ideal da infecção que estaria associada ao perfil N1.

Palavras chave: Neutrófilos, *Mycobacterium tuberculosis*, plasticidade, tuberculose.

ABSTRACT

CARDOSO-SILVA, P. M. **Neutrophils plasticity during *Mycobacterium tuberculosis* infection is related to the human disease progression.** 2017. 99 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), which affects one-third of the world's population, and the infected host can develop both active and latent forms of the infection. Together with resident macrophages, neutrophils appear to be important in the control of Mtb infection and in the formation of granulomas in the lung. Recently. Some studies are breaking paradigms about neutrophils, revealing that in some situations such as cancer, these cells can be polarized to the N1 and N2 profiles, respectively associated with anti-tumor and pro-tumor responses. These findings opened a new perspective on the study of infections, including tuberculosis. Thus the hypothesis of this work is that neutrophil polarization in the N1 and N2 profiles may influence the control of Mtb infection, and hence our objective was to evaluate how these different profiles are related to the pathogenesis of the human disease. Neutrophils were isolated from peripheral blood of 17 healthy volunteers and 19 patients with active tuberculosis. Cells from healthy volunteers were polarized with GM-CSF + IFN- γ for differentiation in the N1 profile, or with IL-4 + IL-13 + TGF- β for differentiation in the N2 profile. Polarized neutrophils were characterized by morphological analysis, production of reactive oxygen species, and gene expression. Neutrophils N1 and N2 were then infected in vitro by Mtb and the phagocytic and microbicidal capacity, as well as the release of NETs and the production of cytokines were analyzed. Neutrophils from patients with active tuberculosis were evaluated for expression of genes correlated to N1 and N2 profiles and established correlations with disease severity. When neutrophils were challenged with Mtb, the N1 group showed an increase in IL-8, IL-1- β , IFN- γ and formation of NETs. In contrast, the N2 profile reveals a subtle production of these inflammatory cytokines, but clearly, increased IL-4 and TGF- β . Furthermore, in the (N2) condition it was not possible to observe the formation of NETs. Interestingly, evaluating microbicidal activity, when neutrophils are polarized, infected by Mtb and co-cultured with PBMC, the mediators released by N1 and N2 potentiate the ability of monocytes to eliminate mycobacteria. On the other hand, gene expression of neutrophils from patients with tuberculosis showed a decrease in TLR4, LCN2 and Dectin1 genes. CCR7 showed a negative correlation with the progression of tuberculosis, so that the greater expression of CCR7 is related to the lower severity of the disease. Gene expression also showed differences in neutrophil profile during the different stages of activation by Mtb. This result reinforces the idea of plasticity of neutrophils according to the microenvironment and helps to better understand how neutrophil subtypes may have different actions against Mtb. In addition, it also indicates that N2 is more related to the disease in its most severe phase, preventing the ideal resolution of the infection that would be associated to the N1 profile.

Key words: Neutrophils, *Mycobacterium tuberculosis*, plasticity, tuberculosis.

RESUMEM

CARDOSO-SILVA, M. P. **La plasticidad de los neutrófilos durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis* está relacionado con la progresión de la enfermedad humana.** 2017. 99 f. Dissertação (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto de 2017.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que afecta a un tercio de la población mundial, y el huésped infectado puede desarrollar tanto la infección activa y latente. Junto con los macrófagos residentes, los neutrófilos parecen ser importantes en el control de la infección por Mtb y formación de granulomas en los pulmones. Estudios recientes están rompiendo paradigmas sobre los neutrófilos. Esos revelaron que en algunas situaciones, como en el cáncer, estas células pueden estar sesgados hacia los patrones de N1 y N2 respectivamente asociados a las respuestas antitumorales y pro-tumorales. Estos resultados han abierto una perspectiva diferente en el estudio de infecciones, incluyendo la tuberculosis. Por lo que la hipótesis es que la polarización de los neutrófilos en N1 y N2 perfiles puede influir en el control de la infección por Mtb, por lo que nuestro objetivo era evaluar cómo estos diferentes perfiles están relacionados con la patogénesis de la enfermedad humana. Los neutrófilos se aislaron de sangre periférica de 17 voluntarios sanos y 19 pacientes con tuberculosis activa. Las células de voluntarios sanos fueron polarizadas con GM-CSF + IFN- γ de perfil diferenciación N1 o IL-4 + IL-13 + TGF- β para diferenciar el perfil de N2. neutrófilos polarizadas se caracterizaron por el análisis morfológico, la producción de especies reactivas del oxígeno y la expresión génica. Los neutrófilos N1 y N2 se infectaron entonces con Mtb in vitro y fagocítica y la capacidad microbida, así como la liberación de NET y la producción de citoquinas se analizaron. Se evaluaron Los neutrófilos de pacientes con TB activa para la expresión de genes relacionados con los perfiles de N1 y N2 y correlaciones establecidas con gravedad de la enfermedad. Cuando los neutrófilos se estimularon con Mtb, grupo N1 tiene una mayor IL-8, IL-1- β , IFN- γ y la formación de los TNE. Por el contrario, el perfil N2 revela sutil producción de estas citoquinas inflamatorias, pero evidentemente, el aumento de IL-4 y TGF- β . Además, la condición (N2) no se observó la formación de los TNE. Curiosamente, la evaluación de la actividad microbida, cuando los neutrófilos son co-cultivaron con PBMC, la polarización celular es de suma importancia para el aumento significativo de la capacidad de matar las micobacterias. Ya la expresión génica de los neutrófilos de pacientes con tuberculosis mostró disminución de los genes TLR4, LCN2 y Dectin1. El CCR7 mostró una correlación negativa con la progresión de la tuberculosis, por lo que la mayor parte CCR7 expresión se asocia con menor severidad. La expresión de genes también mostró diferencias en el perfil de los neutrófilos durante las diferentes etapas de la activación de Mtb. Este resultado apoya la idea de plasticidad de los neutrófilos de acuerdo con el microambiente y ayudar a entender mejor cómo los subtipos de neutrófilos pueden tener diferentes acciones en contra de Mtb. Además, se indica que el N2 están más relacionadas con la enfermedad en su etapa más severa, la prevención de la resolución óptima de la infección que se asoció con el perfil N1.

Palabras clave: neutrófilos, *Mycobacterium tuberculosis*, plasticidad, la tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa ilustrando a incidência de casos de tuberculose em 2015

Figura 2. A origem e a diferenciação de células tumorais derivadas de células mielóides

Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental realizada durante o estudo

Figura 4: Caracterização dos neutrófilos polarizados revelaram diferenças na morfologia nuclear e na atividade metabólica

Figura 5. Análise da expressão gênica das populações de neutrófilos diferenciadas in vitro com os meios condicionantes para N1 e N2.

Figura 6: Quantificação de citocinas a partir do sobrenadante dos neutrófilos polarizados e infectados por Mtb por 24 horas.

Figura 7. A polarização in vitro dos neutrófilos não modifica a sua capacidade fagocítica e microbicida quando infectados com *M. tuberculosis*.

Figura 8. Os neutrófilos polarizados não modulam a capacidade de fagocitose das células mononucleares.

Figura 9. Os neutrófilos polarizados mostram diferentes atividades microbicidas quando co-cultivados com PBMC.

Figura 10. A liberação de NET durante a infecção micobacteriana pode ser alterada de acordo com o subtipo de neutrófilo envolvido no processo.

Figura 11. Expressão gênica de neutrófilos de pacientes com tuberculose ativa sugere uma polarização celular.

Figura 12. Correlação entre expressão gênica e gravidade da doença em pacientes com tuberculose.

Figura 13. Expressão gênica de neutrófilos em diferentes tempos em uma infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

Figuras suplementares

Figura S1: Quantificação de citocinas e quimiocinas presentes no plasma de pacientes com tuberculose

Figura S2: Correlação entre a gravidade da doença tuberculosa em pacientes com tuberculose e a expressão gênica

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Micrograma	HDNs: Neutrófilos de alta densidade
a.C.: Antes de cristo	HIV: Vírus da imunodeficiência humana
AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida	HN1: Peptídeos de neutrófilos humanos tipo 1
ALOX15: Arachidonate 15-Lipoxygenase	HN2: Peptídeos de neutrófilos humanos tipo 2
APTb: Paciente com tuberculose ativa	HN3: Peptídeos de neutrófilos humanos tipo 3
BCG: Bacilo Calmette-Guerrim	HN4: Peptídeos de neutrófilos humanos tipo 4
BSA: Albumina sérica bovina	IFN-γ: Interferon gama
CCR7: Receptor de quimiocina tipo 7	IL-1β: Interleucina 1 beta
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar	IL-10: Interleucina 10
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa	IL-12: Interleucina 12
cpm: Contagem de fotóns por minuto	IL-13: Interleucina 13
CR3: Receptor para complemento tipo 3	IL-17: Interleucina 17
CO ₂ : Dióxido de carbono	IL-4: Interleucina 4
CTRL: Controle	IL-8: Interleucina 8
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	IP-10: Interferon gamma-induced protein 10
DNA: Ácido desoxirribonucleico	LAM: lipoarabinomanana
DOTS: Directly Observed Treatment Short-course	LAS: Leica application suite
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay	LCN2: Lipocalin-2
ERO: Espécie reativa de oxigênio	LDNs: Neutrófilos de baixa densidade
FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto	LPS: Lipopolissacarídeo
GAPDH: Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	<i>M. bovis: Mycobacterium bovis</i>
GM-CSF: Fator estimulador de colônias monócitos granulócitos	MDR: cepas multiressistentes
	mg: Microgramas
	mL: Mililitro
	mm: Milímetros
	MOI: Multiplicity of infection

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

M1: Macrófago tipo 1

M2: Macrófago tipo 2

NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NET: Neutrophil extracellular trap

ng: Nanogramas

nm: Nanometros

N0: Neutrófilo sem estímulo

N1: Neutrófilo tipo 1

N2: Neutrófilo tipo 2

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBMC: Células polimorfo nucleares

PAMP: Padrão molecular associado à patógeno

PBS: Phosphate buffered saline

pg: Picogramas

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato

PRR: Receptor de reconhecimento padrão

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

RFU: Unidades de fluorescência relativa

RNA: Ácido ribonucleico

RPMI: Meio de cultura celular

SBF: Soro bovino fetal

TB: Tuberculose

TB MDR: cepas multirresistentes da tuberculose

T CD4+: Linfócito T auxiliar

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β : Fator de transformação do crescimento tipo beta

Th1: Type 1 T helper cell

Th2: Type 2 T helper cell

TLR2: Receptor semelhante ao Toll 2

TLR4: Receptor semelhante ao Toll 2

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

USP: Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de abreviaturas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.2 Epidemiologia da tuberculose.....	3
1.3 A resposta imune na tuberculose.....	5
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	13
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Casuística.....	18
4.2 Isolamento dos neutrófilos.....	18
4.3 Polarização para o perfil N1 e N2.....	19
4.4 Análise morfológica.....	19
4.5 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	19
4.6 Crescimento bacteriano e estimulação dos neutrófilos.....	20
4.7 Quantificação de citocinas liberadas no sobrenadante de cultura	20
4.8 Atividade fagocítica e microbicida das culturas de neutrófilos.....	21
4.9 Atividade fagocítica e microbicida da co-cultura de neutrófilos e polimorfonucleares (PBMC).....	22
4.10 Visualização de NETs.....	24
4.11 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	25
4.12 Análise de expressão gênica – PCR em tempo real.....	26
4.13 Correlações entre a gravidade da tuberculose e a expressão gênica de neutrófilos de pacientes.....	26
4.14 Estimulação de neutrófilos através do plasma de pacientes de tuberculose.....	27
4.15 Análise estatística	27
5. RESULTADOS	28
5.1 A polarização dos neutrófilos induz diferenças na morfologia nuclear e na atividade metabólica.....	29
5.2 Análise da expressão gênica apresentada por neutrófilos polarizados in vitro para os perfis N1 e N2.....	31
5.3 Os neutrófilos polarizados e infectados por <i>M. tuberculosis</i> revelaram diferenças na resposta imune.....	33

5.4 A modulação na resposta imune promovida pelos diferentes subtipos de neutrófilos reflete no controle microbiano.....	35
5.5 Modulação na liberação de armadilhas extracelulares (NET) pelos diferentes subtipos de neutrófilos.....	39
5.6 Análise da expressão gênica dos neutrófilos de pacientes com tuberculose.....	43
5.7 Busca de correlações entre os níveis de expressão gênica e a progressão da tuberculose.....	44
5.8 As diferenças no perfil de expressão genética dos neutrófilos durante as distintas fases de infecção.....	45
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9. FIGURAS COMPLEMENTARES.....	69
9.1 Figura suplementar S1.....	70
9.2 Figura suplementar S2.....	71
10. ANEXOS.....	72
10.1 ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	73
10.2 ANEXO II: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	75
10.3 ANEXO III: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

O bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), isolado por Robert Koch em 1882, é considerado um bacilo Gram-positivo. Sua parede celular possui características peculiares sendo composta por 60% de lipídios, incluindo LAM (lipoarabinomanana) e ácido micólico (Collins and Kaufmann, 2001), além disso, é seletiva a uma grande quantidade de substâncias. Essa micobactéria é a responsável por causar a tuberculose, uma doença muito antiga que tem acompanhado a humanidade ao longo de sua evolução. Assim como outras doenças, ao longo da história, apesar de exibir momentos de grandes epidemias e depois de recuo nas taxas de infecção, o *M. tuberculosis* pode ter matado mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano (Daniel, 2006).

Pode-se supor que o gênero *Mycobacterium* originou-se à mais de 150 milhões anos. Modernas técnicas de genética molecular e sequenciamento do genoma de várias cepas de Mtb permitiram uma estimativa mais rigorosa do tempo de origem das micobactérias. Esta estimativa é facilitada pela baixa taxa de mutação das mesmas. Desta forma, estima-se que um progenitor precoce de Mtb estava presente na África Oriental há 3 milhões de anos atrás, e que esses bacilos poderiam ter infectado os primeiros homínídeos naquele tempo (Gutierrez *et al.*, 2005).

Esses dados revelam que desde a antiguidade o bacilo Mtb, causador da tuberculose (TB), tem estado presente na população humana. Fragmentos da coluna vertebral de múmias egípcias datadas de 2400 a.C. mostram sinais claros de TB (Zink *et al.*, 2001). A doença exemplifica um caso de co-evolução entre patógeno e hospedeiro (Hershkovitz *et al.*, 2008) e levando-se em consideração esta mútua adaptação, pode-se compreender o caráter pandêmico da TB e o motivo pelo qual, na maioria dos casos, se manifesta após um grande período de latência. Desta forma, não é comum desenvolver a forma ativa da doença após o contato primário com o bacilo.

1.2. Epidemiologia da tuberculose

A tuberculose ainda é um sério problema de saúde pública, com profundas raízes sociais (Ministério_Da_Saúde, 2013). Esta patologia está intimamente ligada à má distribuição de renda e aos maus hábitos, que favorecem situações de maior vulnerabilidade, como o alcoolismo e tabagismo. A partir do último relatório global de TB realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que houve 10,4 milhões de novos casos de tuberculose em todo o mundo e que 1,8 milhões de pessoas morreram de TB no ano de 2015 (Who, 2016).

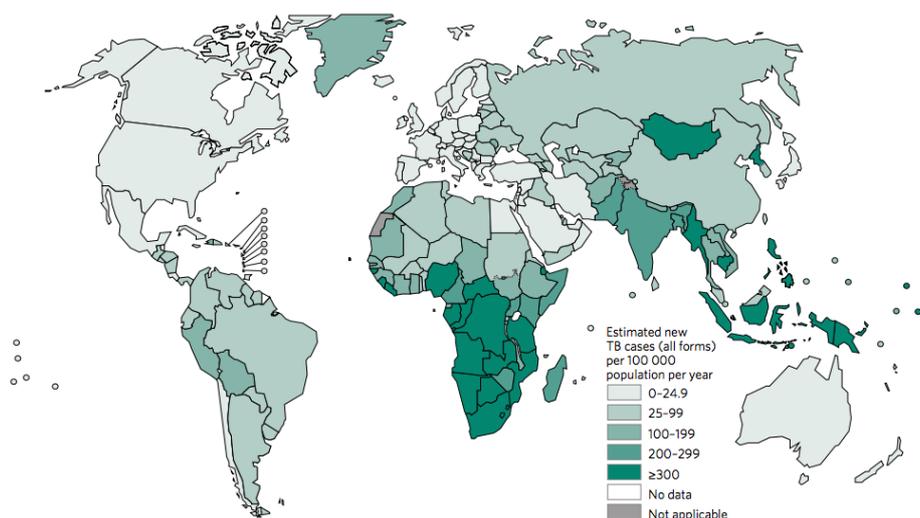


Figura 1. Mapa ilustrando a incidência de casos de tuberculose em 2015. Estimativa do número de novos casos de tuberculose (todas as formas) por 100 mil pessoas (Modificado de Global Tuberculosis Control, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf>).

O aumento global da incidência da TB alcançou seu pico em 2004 e foi seguido de uma lenta queda, compensado pelo crescimento da população. O número de casos continua aumentando anualmente, principalmente nas regiões menos desenvolvidas do globo, como África, Mediterrâneo Oriental e Sudeste Asiático. Entretanto, a história de combate à epidemia por meio da vacinação, data de 1921 quando na tentativa de conter o desenvolvimento da doença na população humana, Albert Calmette e Camille Guérin

desenvolveram a vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin). A BCG é constituída por cepas vivas atenuadas do bacilo *M. bovis*, sendo até os dias de hoje, a única vacina contra tuberculose aprovada e disponível para a população mundial.

Embora essa vacina seja utilizada em muitos países, principalmente em regiões com alto índice de TB, a sua eficiência é parcial. Desta forma a BCG é recomendada pela OMS em áreas de alta prevalência da doença, sendo capaz de prevenir a forma disseminada da TB, bem como outras manifestações da infecção em crianças, como a meningite (Roth *et al.*, 2006; Setia *et al.*, 2006). No entanto, nos adultos, o índice de prevenção da TB pulmonar pela BCG pode variar entre 0% e 80%, de acordo com a população em questão (Svenson *et al.*, 2010). Existem estudos em andamento para a composição de outras vacinas, baseadas ou não no BCG, mas ainda não há nenhuma que possa substituí-la, ou pelo menos ser utilizada em associação para aumentar a sua eficácia (Barker *et al.*, 2009).

Além da disponibilidade de uma vacina contra a TB, existe também a opção terapêutica clássica composta pelas drogas Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol e Isoniazida. O uso de antibioticoterapia e a vacinação marcaram a história da infecção por *Mtb*, sendo responsáveis pela contenção da epidemia global no século passado. Entretanto, as dificuldades de acesso a esses medicamento (em algumas localidades), além do abandono da terapia após a melhora inicial do quadro clínico, estão entre os principais fatores que fizeram com que a OMS implantasse um sistema supervisionado de terapia, o DOTS (do inglês Directly Observed Treatment Short-course). Essa orientação aumenta a probabilidade de cura dos doentes, pois garante um tratamento assistido. O DOTS foi responsável por melhoras na adesão e êxito na terapia contra a TB, no entanto, não evitou que o uso inadequado das drogas contribuísse na seleção de cepas multirresistentes (MDR) (Gandhi *et al.*, 2010). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil nos casos de TB com cepas resistentes o tratamento é

prolongado, podendo ocorrer durante 24 meses, e apresentar mais efeitos colaterais. O custo dessa terapia é maior, bem como a sua chance de falhar.

Indicadores epidemiológicos revelaram que em 2015 cerca de 480.000 pessoas desenvolveram a TB multirresistente (TB-MDR) em todo o mundo, sendo que Índia, China e Federação Russa respondem por quase metade de todos os casos em nível global. Estes dados mostram que a TB-MDR continua a ser uma crise de saúde pública.

Além deste cenário já complexo, a partir da década de 1980, o surgimento da epidemia de AIDS agravou ainda mais o problema da doença no mundo. Devido à imunossupressão enfrentada pelos pacientes HIV positivos, tornam-se evidentes a susceptibilidade à infecção e à reativação da TB latente. A tuberculose é uma das principais co-infecções no paciente HIV + e que acarreta maior morbidade e mortalidade (Granich *et al.*, 2010). Após este agravante na história da TB, quando os casos aumentaram de forma muito significativa, a OMS estabeleceu na conferência ministerial sobre Tuberculose e Desenvolvimento Sustentável, em março de 2000, metas de combate à TB (Saúde, 2006). Entretanto, o último relatório emitido pela OMS revelou que os países precisam melhorar as formas de prevenção, de detecção e de tratamento da doença com objetivo de cumprir as metas globais. Visto que a queda do coeficiente de incidência entre os anos de 2014 e 2015 foi muito pequena, sendo de apenas 1,5%, não atingindo a meta traçada pela Estratégia pelo Fim da Tuberculose.

1.3 A resposta imune na tuberculose

A infecção se inicia por meio da inalação de gotículas contendo bacilos viáveis por um indivíduo doente durante o espirro, tosse ou a fala. A TB acomete principalmente o trato respiratório inferior, sendo os pulmões o primeiro local de estabelecimento dos bacilos, contudo, podem existir outras formas de TB. A doença pulmonar ativa é caracterizada pela dor no peito, tosse intensa e prolongada por mais de três semanas, com produção de muco

com ou sem a presença de sangue (indicativo de estágio avançado). Segundo a Organização Mundial da Saúde, o paciente ainda pode apresentar episódios de febre, perda de apetite, palidez, calafrios, cansaço, suores noturnos e emagrecimento (Saúde, 2017).

A infecção pode ainda, permanecer na sua forma latente, tal fato ocorre com aproximadamente 90–95% das pessoas infectadas. Esses pacientes com TB latente permanecem assintomáticos e não transmitem o bacilo, no entanto são caracterizados como um reservatório do patógeno. A permanência das altas taxas de incidência e prevalência da TB, pode estar associada à infecção latente, visto que a qualquer momento, um fator que gere um quadro de imunossupressão pode levar à reativação da doença (Kaufmann, 2001).

Nos casos em que a infecção assume um caráter latente, o bacilo *Mtb* induz a formação de uma reação inflamatória típica, onde há o acúmulo de células inflamatórias e da imunidade adaptativa ao redor do microrganismo, iniciando a formação de granulomas, fenômeno coordenado principalmente por linfócitos T CD4+ ativados. A formação do granuloma no foco da infecção é um dos aspectos clínicos utilizados no diagnóstico da TB pulmonar (Hernandez-Pando *et al.*, 1997; Flynn and Ernst, 2000; Collins and Kaufmann, 2001). O granuloma, posteriormente, é envolto em fibras colágenas produzidas por fibroblastos, tal sistema pode restringir a disseminação dos bacilos por um longo tempo. Neste ambiente hostil, com baixos níveis de oxigênio e de nutrientes, o *Mtb* diminui seu metabolismo, caracterizando a fase de latência da infecção (Dheda *et al.*, 2005).

Os bacilos que chegam aos alvéolos são fagocitados por macrófagos e células dendríticas, o que é facilitado por interações do patógeno com diversos receptores presentes nas células do sistema imune inato. As células reconhecem os PAMP's (Pathogen-Associated Molecular Patterns) através de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR). Além dos PRRs, outros receptores do sistema imune, como o CR3 (Complement Receptor 3), facilitam a entrada do bacilo opsonizado na célula hospedeira, quando este está revestido por proteínas

do sistema complemento, sem ocorrer a ativação da maquinaria responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem atividade bactericida (Tailleux *et al.*, 2003).

Após a ativação inicial das células residentes pelo Mtb, os neutrófilos são os primeiros fagócitos recrutados do sangue para o espaço brônqu coastalveolar, onde liberam potentes mediadores inflamatórios e atuam na resposta contra o bacilo (D'Avila *et al.*, 2008). O papel protetor dos neutrófilos durante a resposta imune contra Mtb foi evidenciado a partir de diversas observações clínicas e experimentais, mostrando que estas células podem produzir reativos do oxigênio e nitrogênio capazes de conter a infecção (Brown *et al.*, 1987; Perskvist *et al.*, 2002). Outro estudo mostrou que existe uma abundante produção de peptídeos liberados exclusivamente por neutrófilos no sangue de pacientes com TB, tais como HNP-1, HNP-2, PNH-3 e PNH-4. Essas proteínas apresentam atividade quimiotática para outros leucócitos, como fagócitos e linfócitos T, contribuindo indiretamente com a atividade microbicida por ativar a resposta imune celular contra a bactéria (Zhu *et al.*, 2011).

Os neutrófilos podem ainda apresentar um mecanismo microbicida independente da fagocitose, que é a liberação de NETs, ou Neutrophil Extracellular Traps (Drescher and Bai, 2013). Esse mecanismo foi descrito em 2004 por Brinkmann e colaboradores que mostraram que neutrófilos humanos eram capazes de liberar uma estrutura fibrosa formada de DNA associada à histonas e à moléculas como elastase, catelpsina G e mieloperoxidase (Brinkmann *et al.*, 2004). A mieloperoxidase é uma enzima importante que auxilia na liberação da elastase dos grânulos azurófilos, possibilitando que esta migre até o núcleo da célula e realize a degradação de histonas, ligadas ao material genético, proporcionando a sua descondensação e a liberação do DNA (Papayannopoulos *et al.*, 2010). Outro fator importante para esse processo é a presença de EROs (Fuchs *et al.*, 2007; Bianchi *et al.*, 2009; Nishinaka *et al.*, 2011). Experimentos com substâncias antioxidantes reforçaram essa ideia, de forma que o uso

de “scavenger” de EROs, interferência na ação de NADPH oxidase e da mieloperoxidase impedem a liberação das NETs (Kirchner *et al.*, 2012; Mohammed *et al.*, 2013; Vorobjeva and Pinegin, 2016). Esse mecanismo se mostra importante no controle de diversas infecções, em que o patógeno apresenta estratégias de escape do espaço intracelular, como pode ocorrer no caso da Mtb. Desta forma, essa rede aprisiona muitos tipos de microrganismos, podendo assim, levá-los a morte, expondo-os a alta concentração de substâncias microbidas, ou até proporcionando a apresentação de antígenos para outras células do sistema imunológico (Amulic and Hayes, 2011; Braian *et al.*, 2013). A interação entre neutrófilos e Mtb é capaz de desencadear a formação das NETs, assim, embora a micobactéria seja resistente à morte no interior desse tipo celular esse mecanismo a apreende no meio extra celular e pode levar a sua eliminação (Braian *et al.*, 2013).

No início da infecção os neutrófilos auxiliam efetivamente na contenção do parasita, no entanto, ainda há a possibilidade de disseminação de bacilos viáveis. Caso a infecção não possa ser contida, em um primeiro momento, as interações entre neutrófilos e demais fagócitos podem dirigir a resposta de células T, podendo assim, determinar o resultado clínico e imunológico da infecção (Dorhoi and Kaufmann, 2014). Assim, temos que a resposta pode ser rápida e eficaz controlando a replicação da micobactéria ou então pode ser insuficiente, levando a uma inflamação exacerbada e a progressão da doença. Portanto, na fase avançada da TB os neutrófilos podem contribuir para a patologia, mas também podem representar um mecanismo compensatório do hospedeiro, em face à replicação bacteriana descontrolada (Lowe *et al.*, 2012).

Alguns estudos sugeriram o papel negativo dos neutrófilos na patogênese da tuberculose. Em linhagens de camundongos geneticamente suscetíveis infectados experimentalmente e em pacientes com tuberculose ativa, foi mostrado que a insuficiência respiratória e mortalidade estavam associadas a um aumento do número de neutrófilos no

sangue (Barnes *et al.*, 1988; Eruslanov *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2006). A abundância de neutrófilos em casos de infecção avançada está associada à liberação de mediadores que podem causar danos ao tecido se não forem rigorosamente controlados (Eum *et al.*, 2010; Marzo *et al.*, 2014).

Uma descoberta recente mostrou que o IFN- γ é capaz de inibir a produção de IL-17 por células T CD4+, prejudicando a sobrevivência de neutrófilos, muito embora contribua para o aumento dos mesmos no sítio infeccioso. Tal fato acarreta em um aumento da inflamação do pulmão e a progressão da doença. Desta forma, a neutrofilia durante a TB pode indicar falha na resposta inflamatória ou a perda da capacidade de resposta ao IFN- γ (Nandi and Behar, 2011; O'garra *et al.*, 2013).

Classicamente a resposta imune eficaz contra *Mtb* é associada ao predomínio do padrão TH1 sobre o padrão TH2 de resposta no hospedeiro. Interessantemente, alguns autores têm descrito a participação de células que comumente seriam relacionadas a processos alérgicos e/ou na eliminação de helmintos, produtoras de citocinas TH2, participando da resposta imune contra o bacilo (Ashenafi *et al.*, 2014). Assim, evidências crescentes sugerem que um equilíbrio Th1 / Th2 é crucial para controlar a progressão da tuberculose ativa. A IL-12, IFN- γ e TNF- α contribuem para a indução de proteção mediada por Th1 em TB, ao passo que o aumento dos níveis de IL-10 promovem o desenvolvimento de uma resposta de Th2. A IL-10 antagoniza com as citocinas pró-inflamatórias, reprimindo a inflamação exacerbada e levando ao reparo tecidual (Dorhoi and Kaufmann, 2014).

Semelhante à dicotomia Th1 e Th2 de polarização das células T, os macrófagos podem ser polarizados no microambiente para montar respostas M1 e M2 (Biswas and Mantovani, 2010). Produtos microbianos como o LPS, ou o IFN- γ da resposta imune do hospedeiro são capazes de ativar os macrófagos, induzindo a polarização clássica para o padrão M1. Nessa ativação, os macrófagos se tornam potentes efetores que matam microrganismos intracelulares

e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (Sica, A and Mantovani, A, 2012). Em contraste, a ativação alternativa de macrófagos M2 é bem diversa, mas em geral, está envolvida na resposta Th2. Tal ativação atua na imunorregulação, o encapsulamento, a contenção de parasitas, além de promover a reparação tecidual, remodelação e progressão de tumores (Sica, A. and Mantovani, A., 2012). Tal polarização foi bem descrita nessas células e recentemente novos estudos quebram paradigmas também em relação aos neutrófilos. Estes estudos revelaram que estes granulócitos apresentam plasticidade e que também podem apresentar diferentes fenótipos de acordo com o microambiente (Mantovani *et al.*, 2011).

Fridlender *et al.* (Fridlender *et al.*, 2009) forneceu evidências para a existência da polarização dos neutrófilos associados a tumores, N1 (antitumoral) e N2 (pró-tumoral) (Figura 2). Em analogia à polarização que ocorre em macrófagos M1 e M2. Em alguns casos de neoplasia os neutrófilos adquirem diferentes fenótipos, podendo auxiliar na contenção das células cancerígenas e na rejeição tumoral (N1) ou propiciar o crescimento tumoral, invasão e metástase (N2) (Piccard *et al.*, 2012). A ideia de diferentes fenótipos de um tipo celular coexistir no decorrer do câncer não estava esclarecida e havia muitas controvérsias se a polarização N1 e N2 ocorriam concomitantemente. Estudos recentes revelam que existe subpopulações de neutrófilos na corrente sanguínea e que as mesmas possuem proporções de ocorrências diferentes de acordo com a progressão da doença (Sagiv *et al.*, 2015).

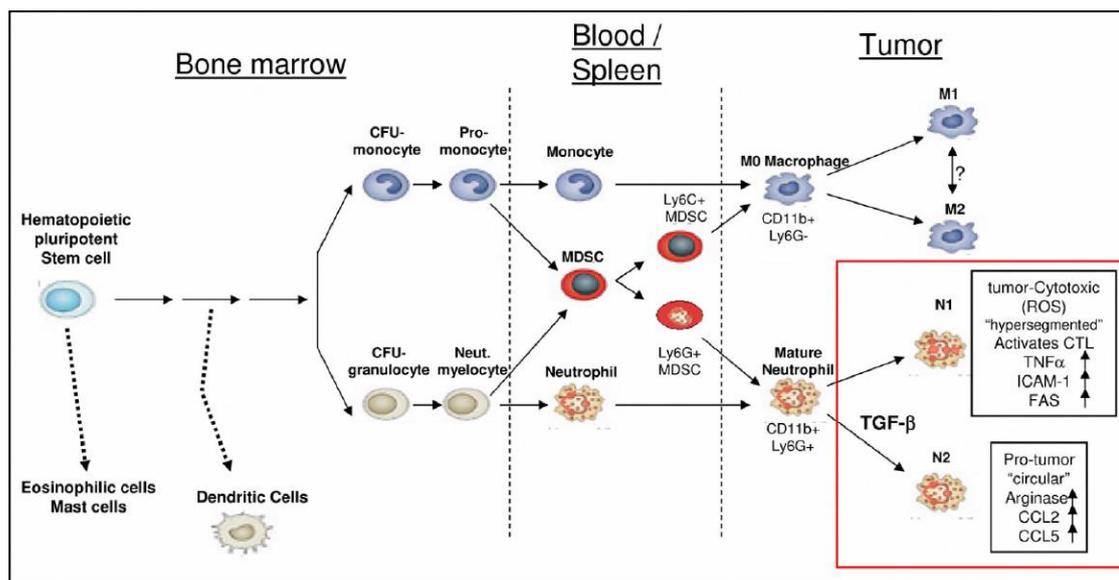


Figura 2. A origem e a diferenciação de células tumorais derivadas de células mielóides. Retirado de (Fridlender et al, 2009 (Fridlender *et al.*, 2009)), baseado em (Murdoch et al., 2008 (Murdoch *et al.*, 2008)) e (Gabrilovich and Nagaraj, 2009 (Gabrilovich and Nagaraj, 2009)).

Os novos achados sobre a plasticidade e a dinâmica dos neutrófilos em casos de câncer revelam uma perspectiva no estudo da infecção por *Mtb* e progressão para a doença ativa. A *M. tuberculosis* proporciona uma diferente ativação e modulação na polarização dos macrófagos (Lugo-Villarino *et al.*, 2011), no entanto, não há registro da influência da polarização dos neutrófilos no controle da tuberculose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar como a polarização nos perfis N1 e N2 pode influenciar a função efetora dos neutrófilos para o controle da infecção *in vitro* por *M. tuberculosis*, e por meio de amostras clínicas, buscar correlações entre a plasticidade dessas células com a progressão da tuberculose humana.

3. DELINEAMENTO EXPERIEMENTAL

Para determinação de como a polarização de neutrófilos *in vitro* modula a resposta contra Mtb, neutrófilos foram obtidos do sangue periférico de indivíduos controle, polarizados *in vitro* nos perfis N1 e N2, e infectados. A partir destas células foram:

1. Caracterizadas fenotipicamente as populações polarizadas quanto sua morfologia e função
2. Avaliadas as capacidades fagocítica e microbicida dos neutrófilos N1 e N2
3. Avaliada a capacidade das células N1 e N2 formar NETs
4. Quantificados os mediadores da resposta imune liberados pelos neutrófilos em cultura, como citocinas e quimiocinas.

Para a busca das correlações em amostras clínicas, neutrófilos foram obtidos do sangue periférico de pacientes com tuberculose ativa.

1. Foi avaliado o perfil de expressão gênica em relação aos neutrófilos de indivíduos controle.
2. Foi realizada a correlação da expressão gênica com a gravidade da doença.
3. Foi correlacionada a expressão de genes relacionados aos diferentes perfis de ativação com o os resultados obtidos no modelo de polarização nos perfis N1 e N2 e infecção *in vitro* *M. tuberculosis*.

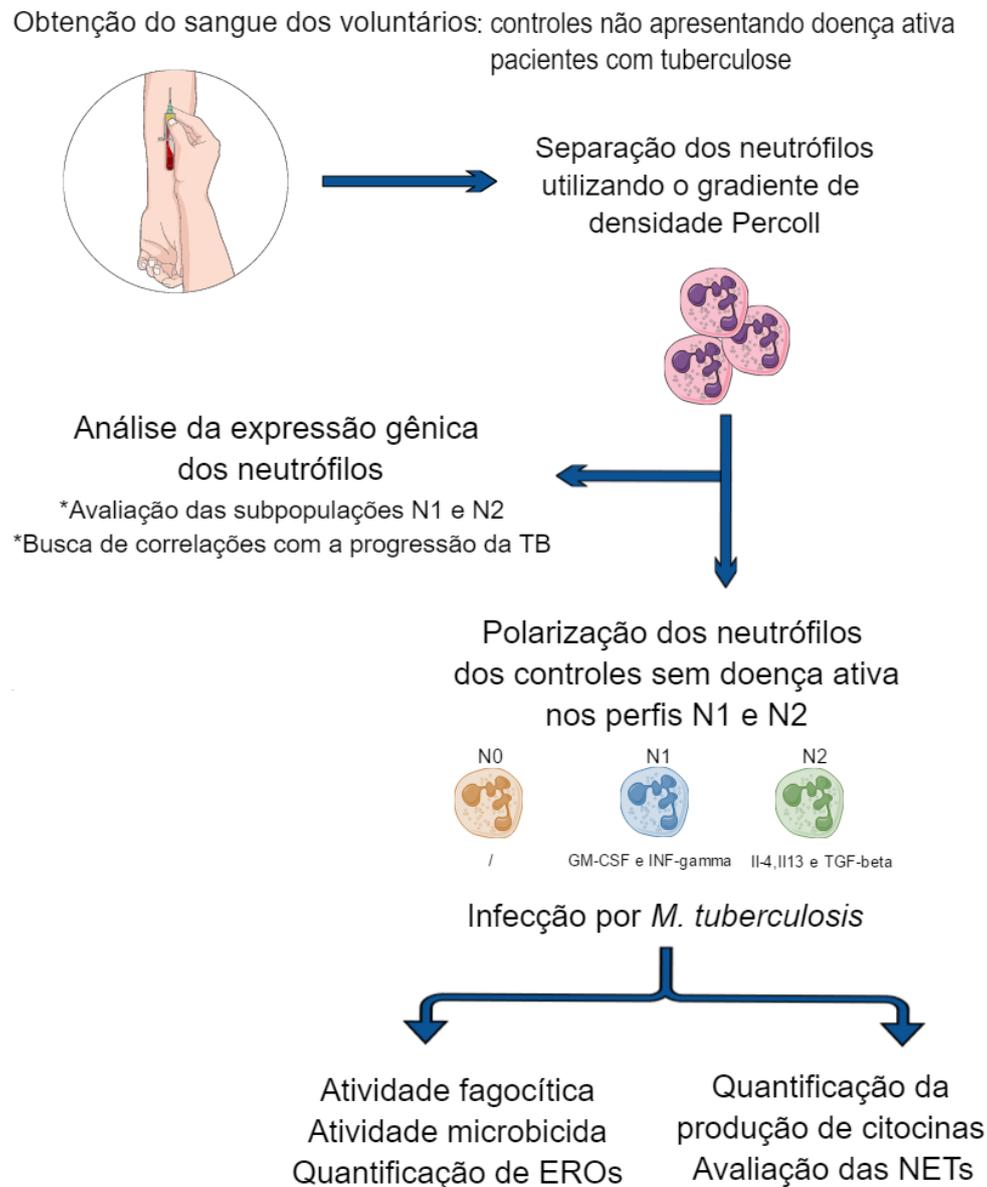


Figura 3 - Representação esquemática do delineamento experimental realizada durante o estudo: Foram coletados 10 mL de sangue periférico de doadores saudáveis e com tuberculose. As amostras passaram por uma separação celular em que os neutrófilos foram isolados através do gradiente de densidade de Percoll. Os neutrófilos provenientes dos pacientes com tuberculose e de voluntários do grupo controle seguiram para os ensaios de qPCR. Uma segunda etapa do estudo consistiu em polarizar os neutrófilos de voluntários do grupo controle, através da incubação por 30 minutos com as citocinas N1(GM-CSF e $IFN\gamma$) e N2 (IL-4, IL-13 e TGF- β) e promover a infecção por *M. tuberculosis* (MOI 1:5) avaliando a atividade fagocítica e microbiana além liberação de NET's e quantificação das citocinas. Anteriormente à infecção, as células polarizadas foram caracterizadas quanto a morfologia nuclear e função.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (CAAE: 44390815300005403 – ANEXO I) e (CAAE: 56443016800005403 – ANEXO II). Os pacientes com tuberculose foram recrutados pelo Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e pelo Centro de Saúde Escola de Ribeirão Preto. Todos os voluntários que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO III) previamente aprovado pelo Comitê de Ética, permitindo a coleta de 10 mL de sangue periférico para o isolamento dos neutrófilos e realização dos experimentos.

Os experimentos *in vitro* contaram com o total de 17 voluntários doadores de sangue, que não apresentavam doença ativa.

Para as análises de correlação com dados clínicos, outra coorte foi avaliada. Foram coletadas amostras do sangue periférico de pacientes com tuberculose ativa (n=19), grupo APTB (Pacientes com tuberculose ativa) e voluntários que não apresentavam a doença ativa (n=29), os quais compuseram o grupo controle (CTRL). Para todos os ensaios os doadores tinham entre 18 e 65 anos, de ambos os gêneros e não apresentavam infecção por HIV.

4.2 Isolamento dos neutrófilos

O sangue periférico foi coletado com tubos Vacutainer contendo heparina (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) e centrifugados por 10 minutos à 400 g em temperatura ambiente. A porção celular foi aplicada sobre um gradiente de densidade de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) formado por duas concentrações (1,080 e 1,095 g/mL⁻¹) e centrifugado por 30 minutos à 600 g à 21°C. A porção de células polimorfonucleares foi coletada na interface dos gradientes e lavadas com tampão fosfato salinas (PBS). A viabilidade e o número de células foram obtidos através do Trypan Blue (Gibco, Grand Island, USA).

4.3 Polarização para o perfil N1 e N2

Para a polarização dos neutrófilos foram utilizados meios condicionados com citocinas, preparados em meio RMPI (Gibco, Grand Island, USA). De forma que para o perfil N1 foram utilizados GM-CSF (20ng/mL) e IFN- γ (10ng/mL), e para o perfil N2 IL-4 (20ng/mL), IL-13 (50ng/mL) e TGF- β (10ng/mL). As escolhas das citocinas foram baseadas nos trabalhos de Fridlender e Mantovani (Mantovani *et al.*, 2004; Fridlender *et al.*, 2009). Antes de todos os experimentos *in vitro* os neutrófilos foram incubados com seu respectivo estímulo por 30 minutos, à 37°C, com 5% de CO₂.

4.4 Análise morfológica

Os neutrófilos foram estimulados por 20 horas com os meios condicionados para a polarização e após esse tempo 50 μ L das amostras foram depositadas em lâminas, estas por sua vez foram centrifugadas em Cytospin a 500 rpm por 3 minutos. As lâminas foram coradas com Panótico (Laborclín, Paraná, Brazil) e a observação da morfologia celular foi realizada através do microscópio óptico (Leica CTR 5000, DM 5000B, Germany) no aumento de 400x e fotografada por meio do software LAS.

4.5 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Após a polarização dos neutrófilos, a produção de EROs foi analisada em resposta à estimulação de PMA 10^{-7} mol L⁻¹ (forbol 12-miristato 13-acetato) (PMA-Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A reação de quimioluminescência foi monitorizada através do luminômetro (AutoLumat Plus LB 953 EG & G Berthold), durante 1 hora, a 37°C na presença de 100 μ M de luminol L⁻¹ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e os dados foram recuperados a partir da contagem de fótons por minuto (cpm). Os resultados foram expressos como área sob a curva de quimioluminescência.

4.6 Crescimento bacteriano e estimulação dos neutrófilos

A cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (American Type Culture Collection, Rockville, MD) armazenada a -70°C foi repicada em meio líquido Mildebrook 7H9 enriquecido com Mildebrook ADCTM (BD Biosciences, Sparks, USA) e incubadas a 37°C , com 5% de CO_2 por onze dias até o crescimento bacteriano atingir turbidez correspondente à escala padrão de McFarland nº1 ($1,0 \times 10^7$ micobactérias/mL). A cultura foi então centrifugada a 3500rpm por 20 minutos e o pellet ressuscitado em PBS estéril, mantendo sempre a concentração de $1,0 \times 10^7$ micobactérias/mL. Desta suspensão 100 μL foi diluído, por meio de uma diluição seriada, para avaliar a viabilidade das micobactérias bem como confirmar o estabelecimento da concentração através da escala padrão de McFarland nº1. Para a infecção *in vitro* as amostras de micobactérias foram submetidas à agitação com pérolas de vidro estéreis para desfazer grumos e utilizadas nos experimentos em um MOI de 1:5.

4.7 Quantificação de citocinas liberadas no sobrenadante de cultura

A produção de citocinas pelos neutrófilos polarizados estimulados ou não com Mtb foi analisada. Um total de 2×10^5 células foram polarizadas com os respectivos meios condicionados (N1 ou N2) durante 30 minutos a 37°C , 5% de CO_2 . O sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS estéril para total retirada das citocinas recombinantes. Em seguida, os neutrófilos foram incubados com uma suspensão de Mtb (MOI = 5) durante 24 horas, a 37°C , 5% de CO_2 . O sobrenadante foi recolhido, congelado e as citocinas foram quantificadas posteriormente. Utilizou-se ensaio imunoenzimático – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para quantificar TGF- β e IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Já as citocinas IL1- β , IFN- γ e IL-4 foram quantificadas pela plataforma personalizada multiplex (16 plex, EMD Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, EUA) e seguiram as instruções do

fabricante. Após incubação com as microesferas magnéticas fluorescentes revestidas com anticorpos de captura específicos para as citocinas listadas acima, as amostras foram avaliadas num instrumento baseado em fluorescência (Luminex® MAGPIX® System, Luminex Corporation, Austin, Texas, EUA). Os dados adquiridos pelo Luminex foram analisados utilizando-se o software Milliplex Analyst v3.5 (Millipore, VigeneTech Inc., Boston, Massachusetts, EUA) e uma curva logística de três parâmetros.

4.8 Atividade fagocítica e microbicida das culturas de neutrófilos

Os neutrófilos (2×10^5) foram distribuídos em 2 placas com 96 poços, tratados com meio condicionado N1 ou N2 durante 30 minutos e depois incubados com Mtb (MOI = 5) durante 30 minutos a 37°C, 5% de CO₂. Após esse tempo, o sobrenadante foi recolhido e ambas as placas foram lavadas duas vezes com RPMI-I à temperatura ambiente para remoção das bactérias não fagocitadas. Em seguida, adicionou-se à placa de fagocitose uma solução de saponina 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a fim de lisar as células e possibilitar a libertação de bactérias fagocitadas no sobrenadante. Subsequentemente, adicionou-se resazurina (1 mg/mL) e a placa foi incubada a 37 °C, com 5% de CO₂ durante 24 horas. A placa foi lida no equipamento espectrofluorímetro (Paradigm SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. Os resultados são expressos em RFU (unidades de fluorescência relativa).

A segunda placa foi utilizada para avaliar a atividade microbicida. Após a remoção das bactérias não fagocitadas, adicionou-se à placa 200 µL de meio RPMI suplementado com 5% de SBF (Soro bovino fetal). Após adicionais 2 horas de incubação em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, tempo suficiente para que ocorra a atividade microbicida, o meio foi removido e foi adicionada uma solução de saponina (0,05%) para lise das células e libertação de bactérias que permaneceram vivas após a atividade microbicida. Subsequentemente, adicionou-se resazurina (1 mg/mL) e a placa

Material e Métodos

foi incubada à 37 °C com 5% de CO₂ durante 24 horas e a placa foi analisada em espectrofluorímetro. A quantidade de bactérias durante o tempo de fagocitose (30 minutos após a infecção) e a atividade microbica (2 horas após a infecção) foram quantificadas indiretamente através da metabolização da resazurina em resorufina pelas micobactérias viáveis. A resazurina apresenta uma coloração roxa e quando metabolizada pelas mitocôndrias das bactérias, apresenta-se na forma de resorufina, com coloração rosa.

A atividade microbica foi obtida por dedução através da fluorescência apresentada pela placa que ficou incubada por 2h (correspondendo a bactérias que sobreviveram à atividade microbica dos neutrófilos), da fluorescência da placa que ficou incubada durante 30 minutos (correspondendo à quantidade de bactérias fagocitadas). Para a porcentagem de morte, o cálculo considerou os dados de RFU da fagocitose como 100%. Para o cálculo da quantidade de bactérias mortas foi realizada uma subtração do resultado em RFU da fagocitose pelo resultado, também em RFU, adquirido da placa de atividade microbica.

4.9 Atividade fagocítica e microbica da co-cultura de neutrófilos e polimorfonucleares (PBMC).

Os neutrófilos (2×10^5) foram distribuídos em 2 placas com 96 poços, tratados com meio condicionado N1 ou N2 durante 30 minutos e depois incubados com Mtb (MOI = 5) durante 30 minutos a 37°C, com 5% de CO₂. Após este tempo foram adicionados 2×10^5 células mononucleares do sangue periférico (PBMC), do mesmo doador, à cultura de neutrófilos e esta co-cultura foi incubada durante mais 2 horas a 37°C, 5% de CO₂. Após 2 horas, o sobrenadante foi recolhido e ambas as placas foram lavadas duas vezes com RPMI-I à temperatura ambiente para remover as bactérias que não foram fagocitadas. Em seguida, adicionou-se à placa de fagocitose uma solução de saponina 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para que as células fossem lisadas e assim as bactérias fagocitadas seriam liberadas no sobrenadante. Subsequentemente, adicionou-se resazurina

Material e Métodos

(1 mg/mL) e a placa foi incubada à 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas. A placa foi analisada através do espectrofluorímetro (Paradigm SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com excitação de 560 nm e emissão de 590 nm. Os resultados são expressos em RFU (unidades de fluorescência relativa).

A segunda placa foi utilizada para avaliar a atividade microbicida. Assim, após a remoção de bactérias não fagocitadas, adicionou-se novo meio RPMI à cultura, mais 5% de SBF e as células foram incubadas durante mais 22 horas, o tempo necessário para ocorrer a atividade microbicida. No final deste período, o meio foi removido e foi adicionada uma solução de saponina (0,05%) para lise de células e liberação de bactérias que permaneceram vivas após a atividade microbicida. Subsequentemente, adicionou-se resazurina (1 mg/mL) e incubou-se a placa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas após esse período a placa seguiu para análise no espectrofluorímetro. A quantidade de bactérias presentes no ensaio de fagocitose (2 horas após a infecção) e da atividade microbicida (24 horas após a infecção) foi quantificada indiretamente através da metabolização da resazurina em resofurina pelas micobactérias viáveis. A atividade microbicida foi obtida por dedução através da fluorescência apresentada pela placa incubada por 24h (correspondente a bactérias que sobreviveram à atividade microbicida dos monócitos) da fluorescência apresentada pela placa incubada por 2 horas (correspondendo à quantidade de bactérias fagocitadas). Para a porcentagem de morte, o cálculo foi feito considerando os dados de RFU de fagocitose como 100% e os resultados da atividade microbicida foram subtraídos desta relação a fim de se obter a porcentagem de bactérias mortas.

4.10 Visualização das NETs.

Os neutrófilos foram adicionados a uma placa de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis de 13 mm de diâmetro (Knittel Glass, Braunschweigi, Alemanha) no fundo e previamente tratadas com 0,01% de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis). As células foram estimuladas com PMA ($0,162 \mu\text{mol L}^{-1}$) ou Mtb (MOI = 5) durante 4 horas, a 37°C , com 5% de CO_2 . Para o controle negativo, alguns poços foram tratados com DNase I (100U/mL) (Invitrogen, Califórnia, EUA) antes da infecção bacteriana para prevenir a formação de NETs. Depois disso, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) à temperatura ambiente, durante 10 minutos, após esse procedimento as células foram permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), durante 5 minutos. Em seguida, a placa foi submetida a lavagens e a etapa de bloqueio, durante 30 min com BSA 3% (Albuminas de soro bovino, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em estufa a 37°C . Subsequentemente os neutrófilos foram incubados com os anticorpos primários Anti-Neutrophil elastase Rabbit e anti-histona H1 mouse (Abcam, Cambridge, EUA) durante 18 horas a 4°C , todos os anticorpos foram diluídos 150 vezes em solução de PBS + 0,25% Tween 20 + 3% BSA (Acros Orgaics, New Jersey, USA). Após essa primeira marcação as células foram lavadas três vezes com $300\mu\text{L}$ da solução de lavagem PBS + 0,25% Tween 20 + 3% BSA e em seguida, iniciou se o tratamento com os anticorpos secundários donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 e rat anti-mouse IgG2 Alexa Fluor 647 (Abcam, Cambridge, EUA), durante 1 hora à temperatura ambiente ao abrigo da luz, esses anticorpos foram diluídos 1000 vezes na mesma solução de lavagem. Passado o tempo de incubação as células foram submetidas a mais uma lavagem e foram incubadas com DAPI, diluído 1000 vezes com PBS (Life Technologies, Eugene, EUA), por 10 minutos a 37°C . Por fim os poços foram novamente lavados e as lâminas foram montadas utilizando Mounting Medium (DAKO, Califórnia, EUA). As células foram analisadas em microscópio confocal de escaneamento a laser (Leica, TCS SP8), e o software LAS (Leica Application Suite) foi utilizado para a aquisição de imagem. A análise microscópica foi

realizada no equipamento multiusuário da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto com o auxílio técnico de Eduardo Tozzato.

4.11 Extração de RNA e síntese de cDNA

Os neutrófilos isolados a partir do sangue periférico foram lavados duas vezes com PBS e o sedimento celular armazenado a -80°C até ao momento da extração do mRNA. Para esta etapa, o material foi descongelado à temperatura ambiente, foram adicionados 750 μL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 250 μL de PBS a cada amostra, seguido por adição de 200 μL de cloroformio e 10 μL de glicogênio e agitação leve por inversão. As amostras foram centrifugadas a 17500 g, 4°C durante 15 minutos e o RNA foi recuperado da fase aquosa por precipitação com álcool isopropílico. As amostras foram incubadas durante toda a noite a -80°C e depois centrifugadas a 17500 g, 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e para melhor obtenção do RNA, adicionou-se 200 μL de cloroformio e 500 μL de álcool isopropílico e as amostras foram sujeitas a uma nova centrifugação. O mRNA obtido foi lavado uma vez em etanol 70% e centrifugado a 17500 g, 4°C durante 15 minutos e ressuspenso em 30 μL de água livre de endonuclease.

Após a extração, o mRNA foi tratado com DNase pelo kit TURBO DNA-free (Ambion, Carlsbad, EUA). O material obtido foi quantificado utilizando um Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, San Jose, Califórnia, EUA). Para realizar a PCR em tempo real, 1080 ng de cada mRNA foi traduzido em cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Assim, o mRNA foi incubado com 3 μL de tampão 10X, 1,2 μL de mistura de dNTP, 3 μL de iniciadores aleatórios 10X e 1,5 μL da enzima MultiScribe Reverse transcriptase (50 U/ μL), mais água livre de endonucleases para completar o volume de 40 μL . A reação foi realizada em termociclador num ciclo de incubação por 10 minutos a 25°C , 2 horas à 37°C e 5 minutos à 85°C .

4.12 Análise da expressão gênica - PCR em tempo real

A expressão genética foi determinada por PCR em tempo real. Os primers utilizados foram determinados de acordo com sua presença em estudos celulares, seguindo a literatura, bem como disponibilidade. Desta forma, foram observadas a expressão de dez genes IP10, CCR7, Dectina-1, TLR4, LCN2, ALOX15 e GAPDH, sendo este último um gene constitutivo. Utilizou-se a Placa TaqMan Array de 96 poços StepOnePlus™ Fast (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e fez-se a reação de amplificação adicionando 30 ng de cDNA por poço de cada amostra. A reação de PCR ocorreu no equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e condições de amplificação: 20 segundos a 95 °C seguido por 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C e 30 segundos a 60 °C.

4.13 Correlação entre a gravidade da tuberculose e a expressão gênica de neutrófilos de pacientes

Os pacientes com tuberculose foram classificados em três grupos de acordo com a extensão da doença observada nos respectivos exames radiológicos. A classificação seguiu os critérios adotados por Abakay e colaboradores (Abakay *et al.*, 2015).

Assim, as lesões foram consideradas mínimas (estágio 1), quando não havia evidência de cavitação, a densidade tecidual foi classificada como leve ou moderada, e localização acima da segunda junção condrosternal. Além disso, estas lesões da fase 1 envolveram apenas um único segmento de um ou ambos os pulmões e a extensão das lesões combinadas não excedeu o volume de um único pulmão. Na doença moderada (fase 2), as lesões eram densamente confluentes, mas a área ocupada por essas lesões não poderia ocupar mais de um terço do volume de um pulmão. Além disso, o diâmetro total da cavitação não excedeu 4 cm em pacientes classificados nesta fase. Pacientes com doença avançada (estágio 3), apresentaram lesões que foram de extensão superior à definida na doença moderada.

4.14 Estimulação de neutrófilos através do plasma de pacientes com tuberculose

Os neutrófilos (1×10^7) de voluntários saudáveis foram incubados durante 4 horas, a 37°C , com 5% de CO_2 , com 200 μL de plasma de pacientes com tuberculose. O plasma utilizado nesses ensaios provinha dos pacientes que apresentavam doença avançada (estágio 3), seguindo a mesma classificação descrita no item 4.13. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e as técnicas de extração de RNA e análise da expressão gênica descritas nos itens 4.11 e 4.12, respectivamente, foram iniciadas. No final, três grupos distintos de neutrófilos saudáveis foram estimulados com um pool de oito diferentes plasmas.

4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A significância estatística foi feita utilizando a análise de variância de uma via e a comparação entre os grupos foi realizada utilizando Turkey post test. Para a análise e comparação da expressão gênica entre o grupo controle e pacientes com tuberculose, utilizou-se o teste de Mann-Whitney e as correlações com lesão pulmonar foram realizadas pela análise de correlação de Rank de Spearman. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 A polarização dos neutrófilos induz diferenças na morfologia nuclear e na atividade metabólica

Para observar os efeitos dos meios de condicionamento N1 e N2 na morfologia dos neutrófilos, em nossas condições experimentais, tratamos as células e analisamos por microscopia óptica sua morfologia nuclear. A Figura 4A evidência que na condição basal (N0), quando os neutrófilos não estavam passando por nenhum tratamento, eles apresentam o núcleo mais segmentado. Figura 4 D revela um zoom nesta mesma condição N0 realizada pelo software de aquisição de imagem. Quando os neutrófilos foram condicionados com meios N1 (Figura 4B e zoom na Figura 4E) eles possuíram, em sua maioria, um núcleo segmentado, enquanto o subtipo N2 (Figura 4C e zoom em 4F) revelou um núcleo circular, uma morfologia muito distinta daquela exibida por N0 e N1.

Além disso, para entender se nossas condições de polarização também afetariam a atividade dessas células, avaliamos sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs). A Figura 4-G mostra que o meio condicionado promoveu uma diferenciação no perfil dos neutrófilos. Nas condições basais, N1 é capaz de liberar níveis elevados de EROs, enquanto N0 e N2 não são produtores dos radicais livres analisados neste trabalho. Além disso, quando estimulamos com PMA, que é um estímulo potente para a libertação deste mediador, observamos que N0 bem como N1 são capazes de libertar EROs. Já o perfil N2 se mostra mais refratários ao estímulo e continuou a produzir baixos níveis de EROs.

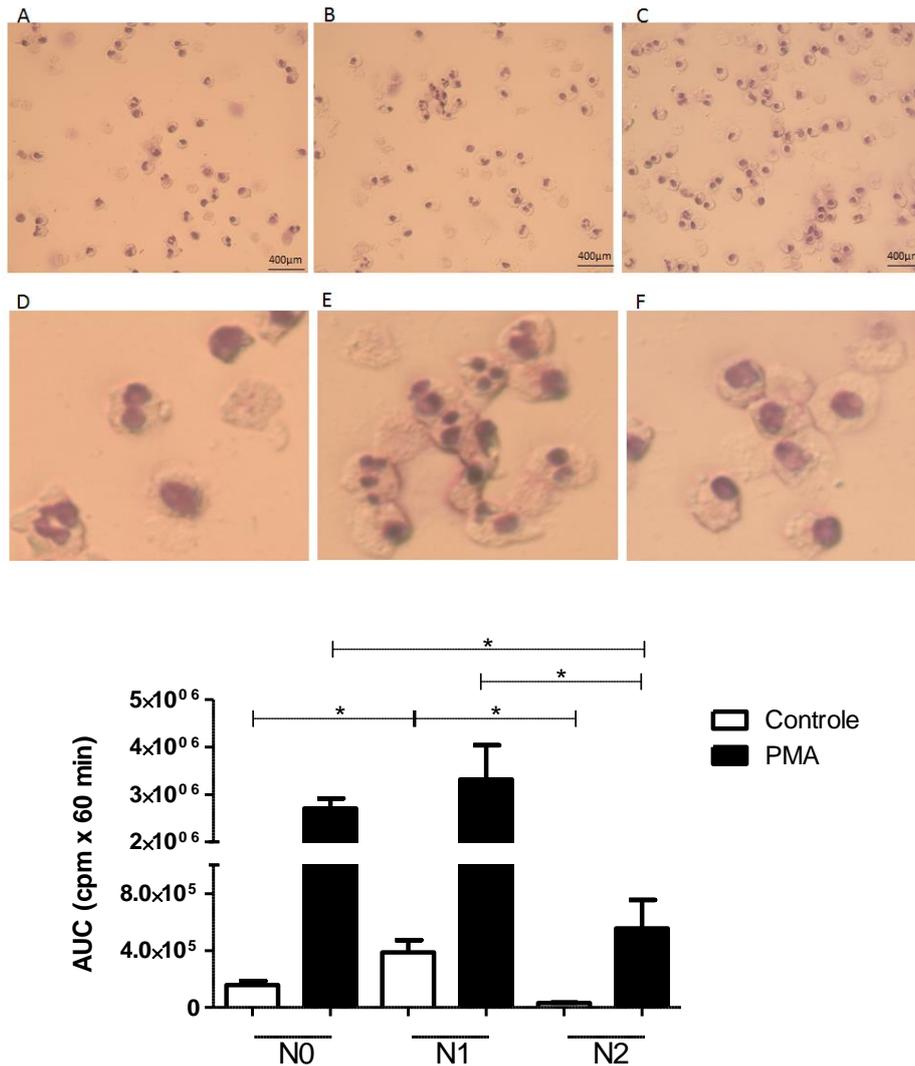


Figura 4: Caracterização dos neutrófilos polarizados revelaram diferenças na morfologia nuclear e na atividade metabólica. Fotografia de microscopia óptica mostra os neutrófilos polarizados A-N0, B-N1 e C-N2. Essas células foram submetidas a 20 horas de estimulação, após esse período 50 μ L das amostras foram transferidas para lâminas de vidro, estas por sua vez foram centrifugadas em Cytospin a 500 rpm por 3 minutos. As lâminas foram coradas com Panótico (Laborclin, Paraná, Brazil) e a observação da morfologia celular foi realizada através do microscópio óptico (Leica CTR 5000, DM 5000B, Germany) no aumento de 400x e fotografada por meio do software LAS. Ampliação original, \times 400. As imagens D, E e F correspondem respectivamente aos grupos N0, N1 e N2 e estes foram obtidos através de um corte e aumento de 450% da imagem original. **G.** Os neutrófilos foram polarizados com seu respectivo estímulo por 30 minutos, após essa incubação foi analisada a produção de espécies reativas de oxigênio de cada subtipo celular com estímulos PMA (10^{-7} mol L⁻¹) ou não. O ensaio ocorreu ao longo de uma hora no equipamento do luminômetro e foi registrada em fótons por minuto. O gráfico foi construído a partir de quatro experimentos independentes e mostra os valores de quimioluminescência pela área sob a curva. 133x73mm (300x300 DPI).

5.2 Análise da expressão gênica apresentada por neutrófilos polarizados *in vitro* para os perfis N1 e N2

Buscamos caracterizar os diferentes perfis de neutrófilos por meio da expressão gênica. Desta forma, avaliamos a expressão gênica de neutrófilos polarizados *in vitro* de doadores saudáveis.

Com os resultados da figura 5 podemos observar tendências importantes sobre tais células. De modo que, o grupo N2 apresentou menor expressão de LCN2 e Dectina-1, assim como um sutil aumento de CCR7. Já os neutrófilos polarizados para o perfil N1 apresentaram um padrão oposto ao grupo N2, revelando um aumento na expressão dos genes LCN2 e Dectin-1. Embora os resultados não tenham apresentado diferenças estatísticas significativas eles foram suficientes para revelar que essas células são capazes de expressar TLR4, LCN2, DECTIN-1, ALOX15, IP-10 e CCR7.

Esses resultados ainda revelaram o quanto a caracterização das diferentes subpopulações de neutrófilos ajuda a definir melhor o perfil dessas células e irá auxiliar no entendimento de qual tipo celular é predominante em pacientes com tuberculose.

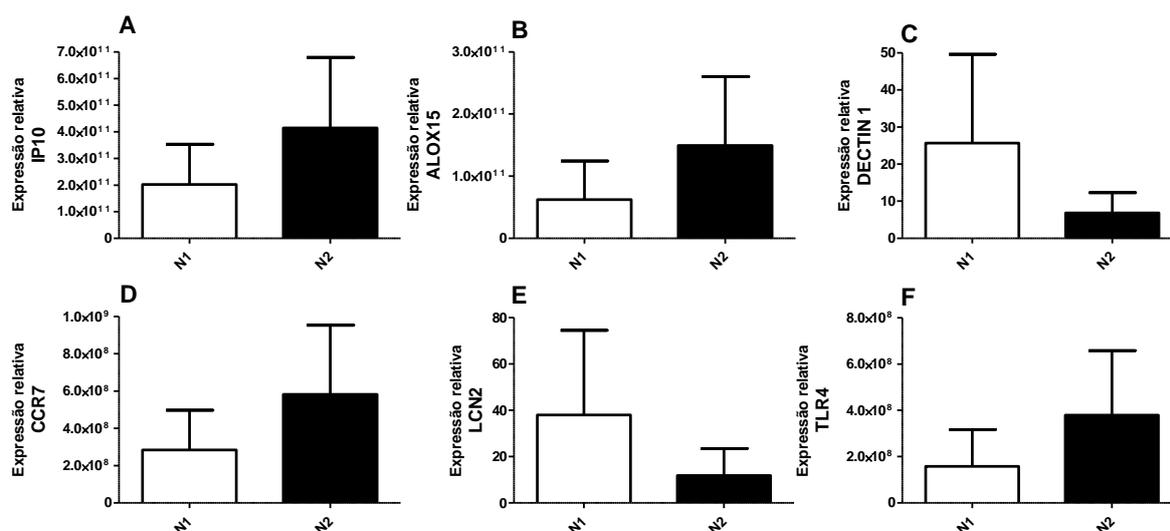


Figura 5. Análise da expressão gênica das populações de neutrófilos diferenciadas in vitro com os meios condicionantes para N1 e N2. Os neutrófilos de voluntários saudáveis foram incubados com seus respectivos estímulos (\emptyset , N1 e N2) durante 4 horas após esse período a expressão gênica foi analisada para comparar as diferenças entre os perfis N1 e N2. Todos os valores apresentados estão descontados do gene constitutivo (GAPDH) e da expressão relativa amostrada pelo grupo de referência N0. Todos os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$.

5.3 Os neutrófilos polarizados e infectados por *M. tuberculosis* revelaram diferenças na resposta imune

Mostramos que em nossas condições experimentais, os neutrófilos polarizados possuem morfologia e atividades metabólicas distintas. Para avaliar se este fenótipo poderia influenciar na resposta contra a tuberculose, buscamos observar se os neutrófilos polarizados *in vitro* têm papel diferencial na produção de citocinas na presença da infecção por Mtb.

N0, N1 e N2 foram desafiados com micobactérias e cada subtipo celular apresentou produção de citocinas distintas (Figura 6). Espontaneamente, os três subtipos possuem a mesma capacidade em liberar IL-1 β . No entanto, a grande diferença entre os grupos celulares torna-se clara quando em contato com o Mtb. Devido a infecção o grupo N1 apresenta duas vezes mais a produção de IL-1 β quando comparado com os grupos N0 e N2. A liberação de IL-8 também foi avaliada e nós demonstramos que espontaneamente N0 e N2 não produzem esta citocina, enquanto que N1, mesmo quando não infectado, produz dez vezes mais IL-8 do que os demais perfis. Na presença de Mtb, os diferentes tipos celulares mostraram aumento da produção de IL-8, porém N1 ainda é capaz de apresentar maior produção desta citocina, quando comparado a N0 e N2. Os neutrófilos polarizados apresentaram características peculiares. As células que têm o perfil N1 foram as únicas a produzir IFN- γ e mesmo quando infectadas por Mtb este grupo manteve os mesmos níveis desta citocina. Em contraste, a produção de IL-4 foi observada em neutrófilos com perfil N2, os demais grupos não apresentam a produção desta citocina. Curiosamente, a infecção também foi capaz de alterar a liberação de IL-4. Assim, os neutrófilos N2 infectados tiveram uma produção três vezes maior que o mesmo grupo que não receberam a micobactéria. A infecção por Mtb também foi capaz de modular a produção de TGF- β . Nesta mesma figura observa-se que as células com o perfil N2, de forma espontânea, possuem uma elevada capacidade de liberação de TGF- β . No entanto, quando estas células são infectadas por Mtb a produção desta citocina diminui

pela metade. Os outros perfis N0 e N1 apresentaram pequena produção dessa citocina e não ocorreu modulação na sua produção quando desafiados por Mtb.

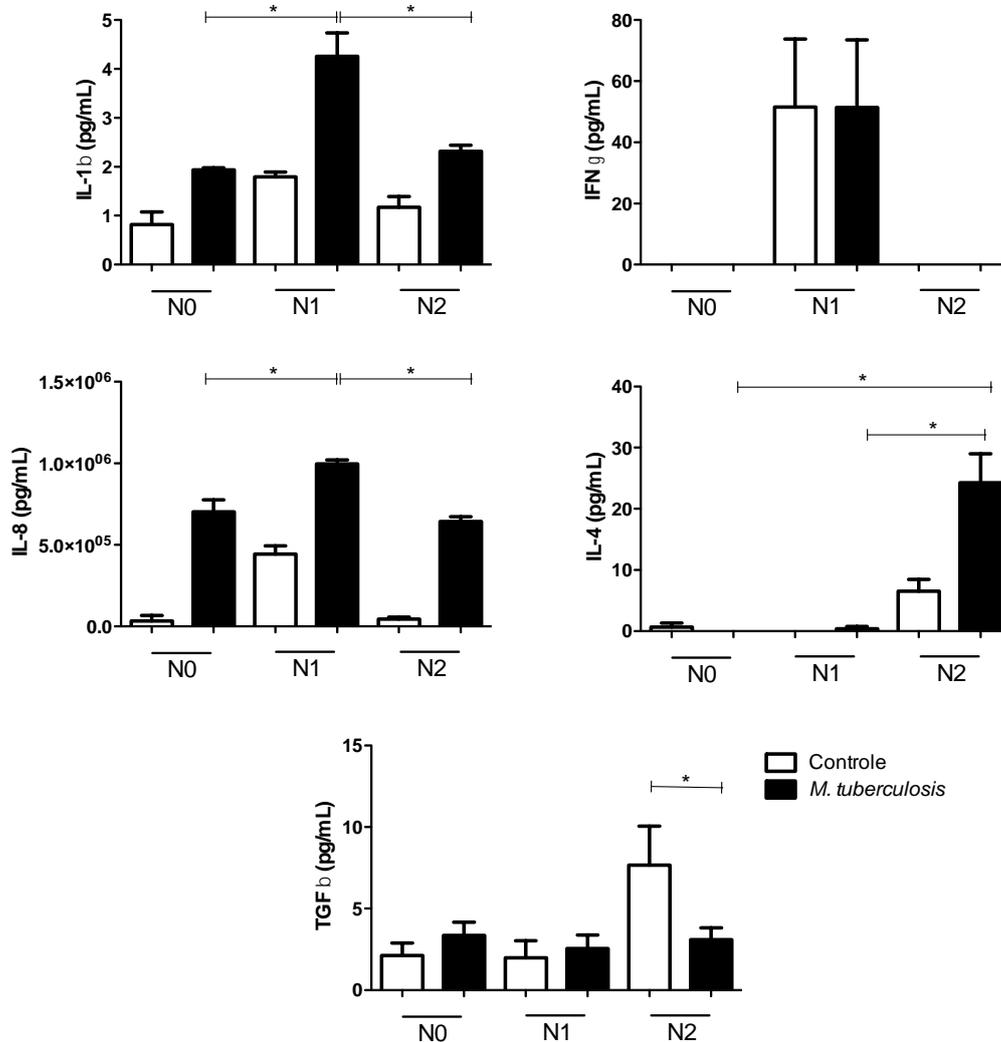


Figura 6: Quantificação de citocinas a partir do sobrenadante dos neutrófilos polarizados e infectados por Mtb por 24 horas. Os neutrófilos (2×10^5) isolados do sangue periférico de doadores saudáveis foram polarizados *in vitro* com meios condicionados por 30 minutos e desafiados ou não por Mtb (MOI 5: 1), representados por barras pretas e abertas respectivamente. Após 24 horas de infecção *in vitro*, o sobrenadante foi recolhido e foi avaliado a liberação de citocinas utilizando um kit personalizado (MILLIPLEX® MAP Citocina Humana / Quimiocina, Millipore) (IL-1 β , IFN- γ e IL-4) ou ELISA (IL-8 e TGF- β). Os resultados foram expressos em pg/mL e analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com significância $P < 0,05$.

5.4 A modulação na resposta imune promovida pelos diferentes subtipos de neutrófilos reflete no controle microbiano

Uma vez que as citocinas foram moduladas de acordo com o perfil dos neutrófilos, questionamos se os mediadores liberados pelos neutrófilos polarizados poderiam ser importantes para modular a atividade microbicida contra Mtb. Para responder a essa pergunta, neutrófilos polarizados foram infectados por Mtb. Os experimentos não revelaram diferenças na atividade fagocítica (Figura 7A) e microbicida (Figura 7B).

Com esses resultados investigamos se a mudança no padrão de mediadores produzidos por N1 e N2 poderia influenciar o microambiente durante a TB. Para isso, co-cultivamos neutrófilos polarizados e infectados por Mtb com células polimorfonucleares (PBMC). A atividade fagocítica em todos os grupos foi semelhante, mostrando que os neutrófilos polarizados não foram capazes de modular essa resposta (Figura 8).

As células polimorfonucleares que não estavam em co-cultura com os neutrófilos e que foram infectadas por Mtb ao longo de 24 horas, mostraram a mesma capacidade de eliminar as bactérias previamente fagocitadas, quando comparamos com o grupo N0 (figura 9). Entretanto, a presença de neutrófilos polarizados aumentou a atividade microbicida dos monócitos. Interessantemente, quando o PBMC está em co-cultura com N1 ou N2 o índice microbicida aumenta significativamente. Assim, foi possível mostrar, com esses experimentos, que os neutrófilos polarizados não foram capazes de desenvolver sozinho atividades microbicidas significativas (figura 7B). No entanto, seus produtos ou até mesmo o contato celular podem modular a capacidade microbicida de outras células fagocíticas (figura 9).

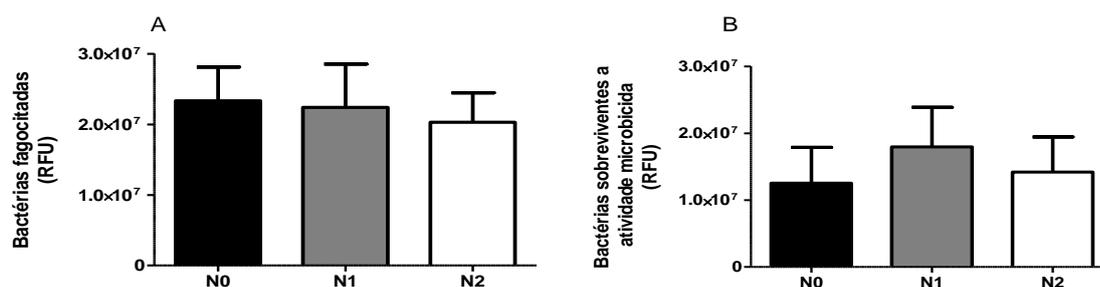


Figura 7. A polarização *in vitro* dos neutrófilos não modifica a sua capacidade fagocítica e microbicida quando infectados com *M. tuberculosis*. Os neutrófilos (2×10^5) isolados a partir de doadores controle foram polarizados *in vitro* com meios condicionados durante 30 minutos e depois infectados com Mtb (MOI = 5) durante 30 minutos. **A.** Para o ensaio de fagocitose, as bactérias não fagocitadas foram removidas por lavagem da placa, e as células foram lisadas com saponina 0,05%. A resazurina foi adicionada à cultura e após 24 horas de metabolismo pelas bactérias, a conversão de resazurina em resofurina foi quantificada por espectrofluorímetro (excitação 560 nm, emissão 590 nm). **B.** A atividade microbicida foi avaliada a i pós 2 horas de desafio com Mtb e o gráfico mostra as bactérias que sobreviveram a este processo. O resultado mostra a diferença entre os valores de RFU na fagocitose de cada grupo e seu de respectivo valor de RFU obtido após o tempo de atividade microbicida. Este é um resultado representativo de oito experimentos independentes e foi analisado pelo teste não-paramétrico de Friedman, com significância $p < 0,05$.

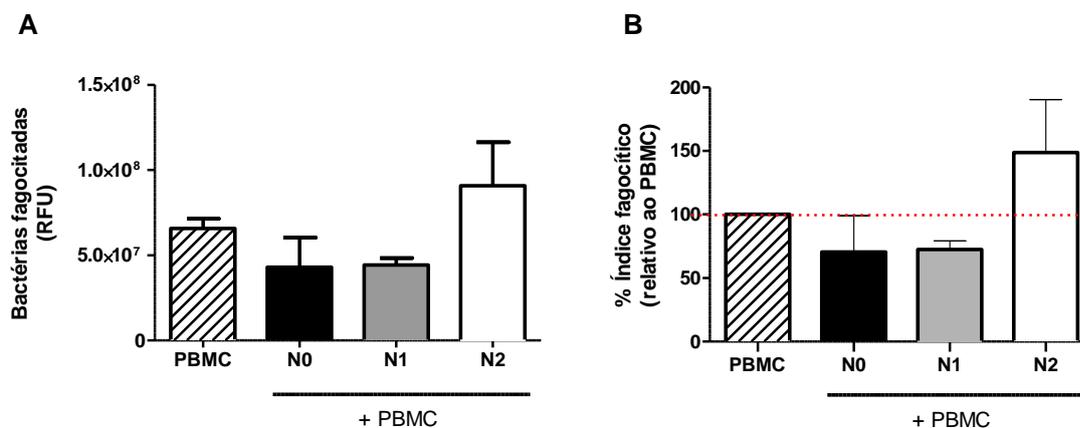


Figura 8. Os neutrófilos polarizados não modulam a capacidade de fagocitose das células mononucleares. Os neutrófilos polarizados (2×10^5) foram incubados com Mtb (MOI = 5) e após 30 minutos foram adicionados PBMC de doadores de saúde aos neutrófilos numa proporção de 1: 1. A co-cultura foi incubada durante 2 horas, lavada para remover bactérias não fagocitadas e as células foram lisadas com saponina 0,05%. A resazurina foi adicionada à cultura e após 24 horas de metabolização por bactérias, a conversão de resazurina em resofirina foi quantificada por espectrofluorímetro (excitação 560 nm, emissão 590 nm). **A.** Os resultados mostram a diferença entre os valores das Unidades de Fluorescência Relativa (RFU) na atividade fagocítica de cada grupo. **B.** A percentagem de índice fagocítico foi obtida da seguinte forma: fixou-se o grupo PBMC como 100% e proporcionalmente escalou-se os valores dos demais grupos. Este é um resultado representativo de cinco experimentos independentes e foram analisados pelo teste não-paramétrico de Friedman, com significância $p < 0,05$.

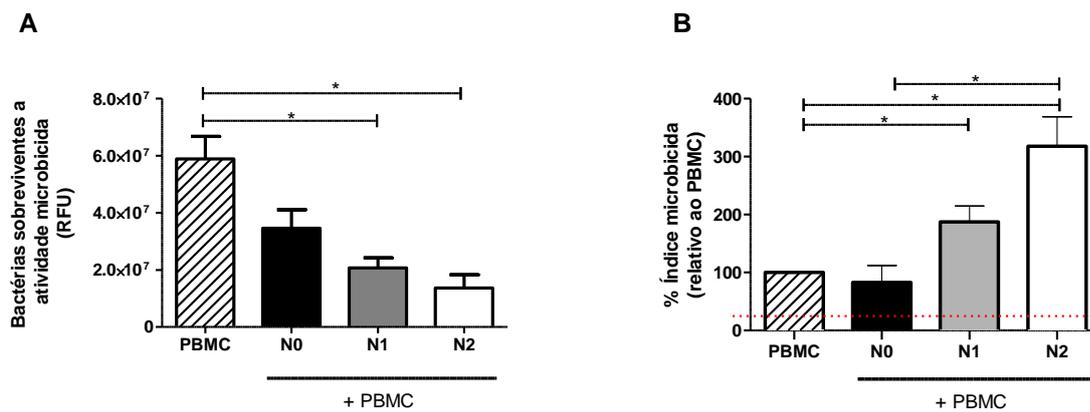


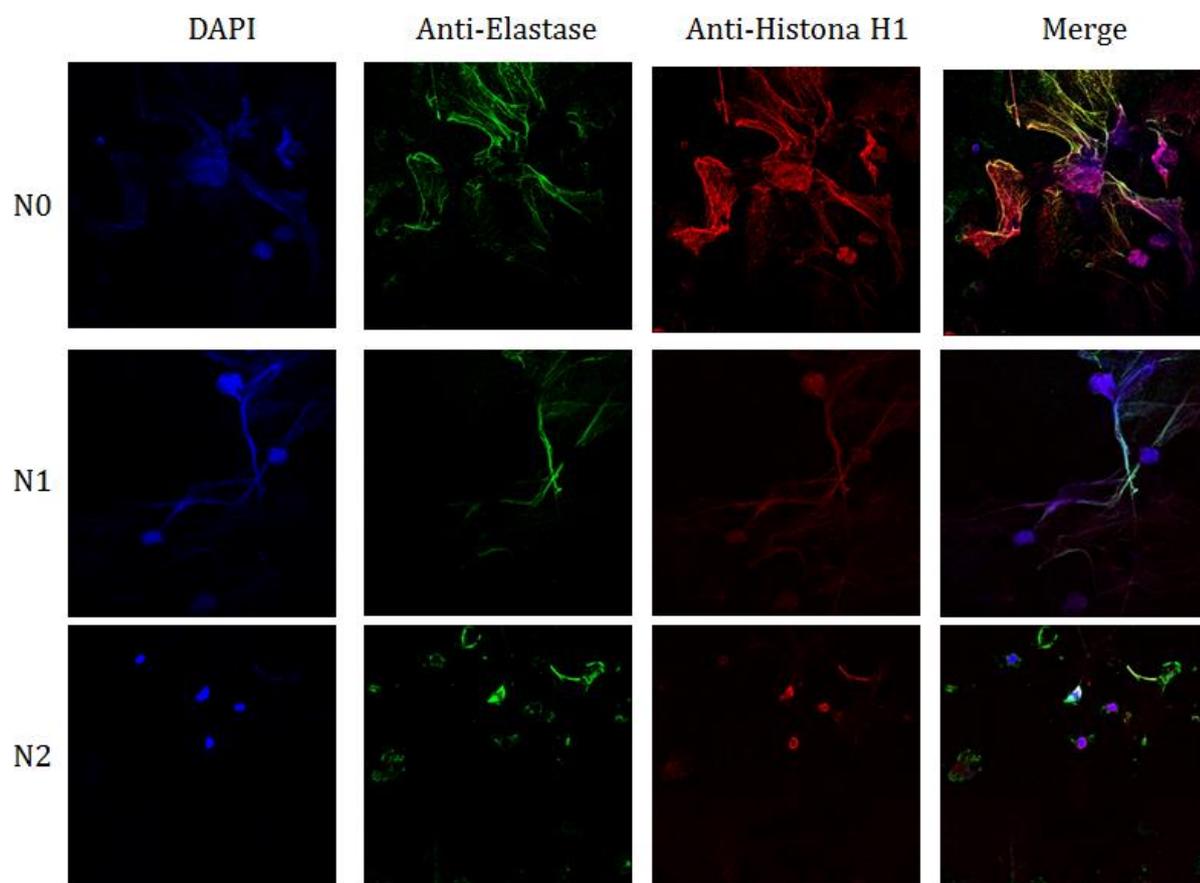
Figura 9. Os neutrófilos polarizados mostram diferentes atividades microbicidas quando co-cultivados com PBMC. Os neutrófilos polarizados (2×10^5) foram infectados por Mtb (MOI = 5), após 30 minutos as células mononucleares do sangue periférico foram adicionados aos neutrófilos na proporção de 1: 1. A co-cultura foi incubada durante 2 horas, após esse tempo os poços foram lavados para remover as bactérias não fagocitadas e voltaram para a incubação durante mais 22 horas. Após este período, as células foram lisadas com saponina 0,05% e as bactérias fagocitadas foram quantificadas pela conversão da resazurina em um espectrofluorômetro (excitação 560 nm, emissão 590 nm). **A.** A atividade microbicida foi avaliada após 22 horas de desafio com Mtb e o gráfico mostra as bactérias que sobreviveram a este processo. Os resultados mostram a diferença entre os valores de RFU dados pela fagocitose de cada grupo e seu respectivo valor de RFU obtido após o tempo de atividade microbicida. **B.** A porcentagem do índice microbicida foi obtida da seguinte forma: fixou-se o grupo PBMC como 100% e proporcionalmente escalou os valores dos demais grupos. Este é um resultado representativo de cinco experimentos independentes e foram analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com significância $P < 0,05$.

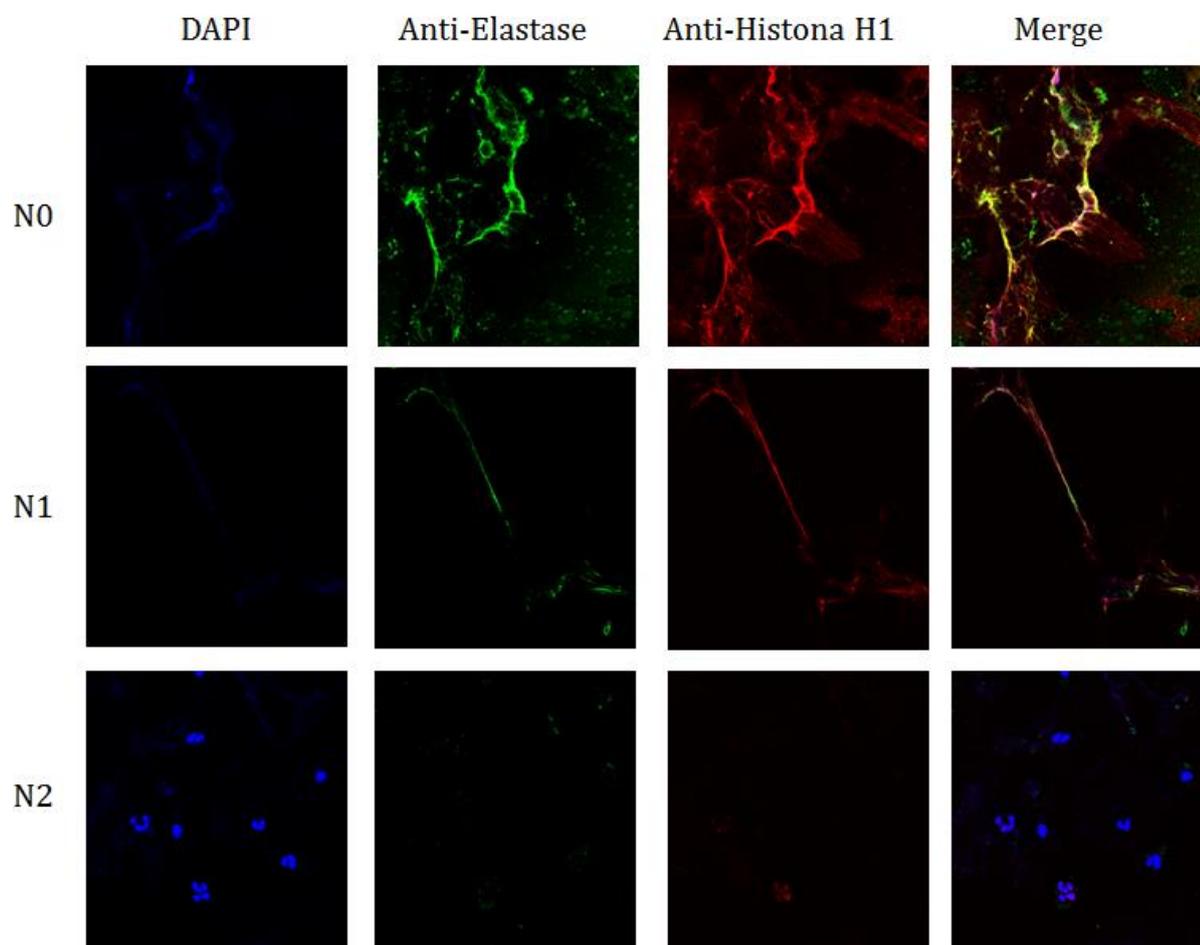
5.5 Modulação na liberação de armadilhas extracelulares (NET) pelos diferentes subtipos de neutrófilos

Os neutrófilos podem também apresentar outros meios para restringir o crescimento bacteriano, como por exemplo a liberação de armadilhas extracelulares (NET). Esse mecanismo foi bem descrito por Brinkmann et. al. (Brinkmann *et al.*, 2004) e neste trabalho decidimos avaliar a liberação das NETs dos diferentes perfis de neutrófilos. Por meio da Figura 10 podemos observar 3 painéis de análise de microscopia, em que foi realizado uma tripla coloração. A marcação por DAPI, em azul, evidencia o núcleo dos neutrófilos, em verde destaca-se a elastase extracelular e em vermelho a histona H1. A última coluna de cada painel mostra a co-marcação, evidenciando a liberação das NETs.

O PMA é amplamente utilizado como controle positivo da liberação da NET e nesse estudo foi usado para o mesmo fim. A Figura 10A destaca que N1 e N0 são completamente estimulados a liberar todo o conteúdo de DNA para o espaço extracelular. No entanto, interessante N2 se mostra refratário a liberação de seu conteúdo nuclear (Figura 10A). Quando Mtb foi adicionado à cultura, este perfil foi mantido e N2, ao contrário do observado para N0 e N1, não foi capaz de liberar NETs (Figura 10B). Utilizando a DNase como controle negativo para clivar qualquer DNA liberado, não observamos as estruturas NET em qualquer condição (Figura 10C), provando que as estruturas observadas foram formadas pelo DNA extracelular liberado.

Células tratadas com PMA



Células infectadas por *M. tuberculosis*

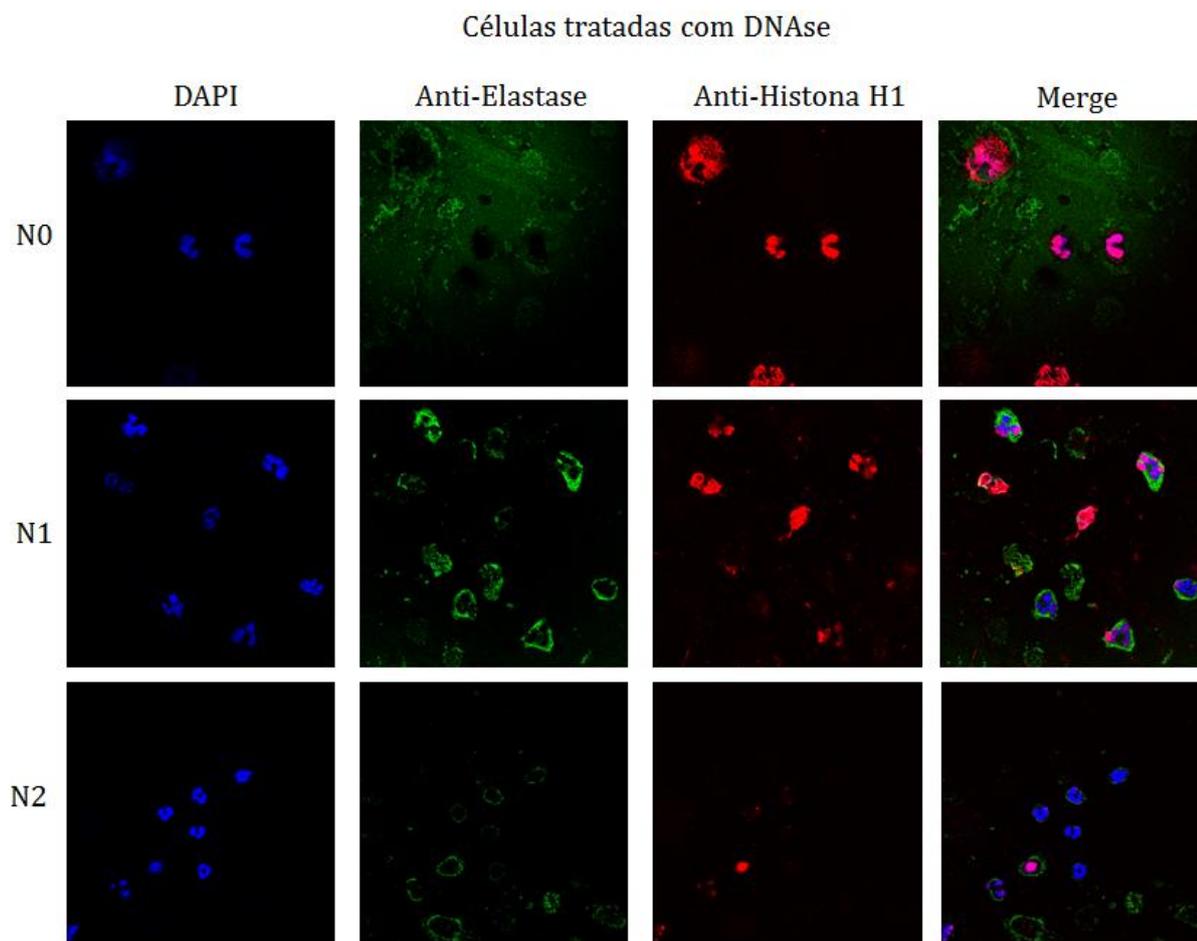


Figura 10. A liberação de NET durante a infecção micobacteriana pode ser alterada de acordo com o subtipo de neutrófilo envolvido no processo. Os neutrófilos (7×10^4) receberam os seus respectivos estímulos (\emptyset , N1 e N2) durante 30 minutos, (A) como controle positivo as células foram estimuladas com PMA ($0,162 \mu\text{mol L}^{-1}$) durante 4 horas. (B) ou foram infectadas com Mtb durante 4 horas ($\text{MOI} = 5$). Em (C), foi utilizada DNase I como controle negativo, de modo que as células receberam este tratamento 30 minutos antes da infecção por Mtb. Os neutrófilos polarizados foram submetidos a coloração para núcleo com DAPI (azul), para elastase de neutrófilos (verde) e para histona H1 (vermelho). As células foram analisadas com o microscópio confocal de varredura a laser, e a co-localização dos marcadores mostra a formação de NETs. Ampliação de 400 x.

5.6 Análise da expressão gênica dos neutrófilos de pacientes com tuberculose

Os neutrófilos desempenham um papel fundamental na fase inicial da infecção, a amostra analisada revelou como está o perfil de ativação genética destas células na fase inicial da tuberculose. Podemos observar pela Figura 11 a expressão de genes característicos de polarização e que também tem uma importante ação na infecção por Mtb. Nos pacientes com a tuberculose ativa, o que se destacou foi a supressão da expressão dos genes Dectina-1, LCN2 e TLR4, quando comparada ao grupo controle não doente. O CCR7 também foi avaliado, e não foram verificadas diferenças entre os grupos. Os genes ALOX 15 e IP-10 apresentaram-se levemente aumentados nos pacientes, apesar desta alteração não ter sido significativa.

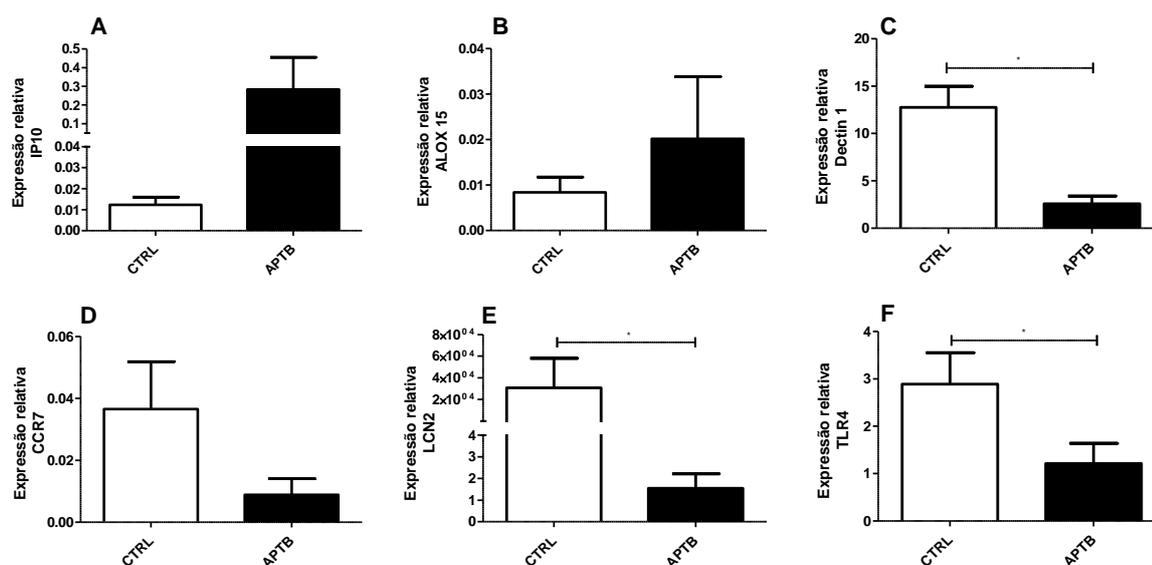


Figura 11. Expressão gênica de neutrófilos de pacientes com tuberculose ativa sugere uma polarização celular. A expressão gênica de neutrófilos de voluntários saudáveis (CTRL) e pacientes com tuberculose ativa (APTB) foram analisadas e comparadas. Os gráficos mostram a expressão de A. IP10, B. ALOX15, C. DECTIN1, D. CCR7, E. LCN2 e F. TLR4. Todos os valores apresentados já estão descontados do gene constitutivo (GAPDH), e foram analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com significância $p < 0,05$.

5.7 Busca de correlações entre os níveis de expressão gênica e a progressão da tuberculose

A expressão de genes por neutrófilos pode contribuir para a melhor compreensão de como essas células atuam na infecção contra Mtb. Desta forma, também foi realizada a correlação entre os níveis de expressão gênica e a progressão da tuberculose. Para tanto, os pacientes foram divididos em três estágios da apresentação clínica, dependendo de sua gravidade. O estágio 1 corresponde ao quadro de menor gravidade, o estágio 2 ao moderado e o estágio 3 ao mais grave. Estes resultados estão organizados na Figura 12, onde podemos ver a correlação entre a expressão gênica e a gravidade da tuberculose. Em todas as análises, apenas com o gráfico 12-D podemos observar correlação entre os dados, de forma que, a maior expressão de CCR7 está diretamente relacionada à menor gravidade da tuberculose.

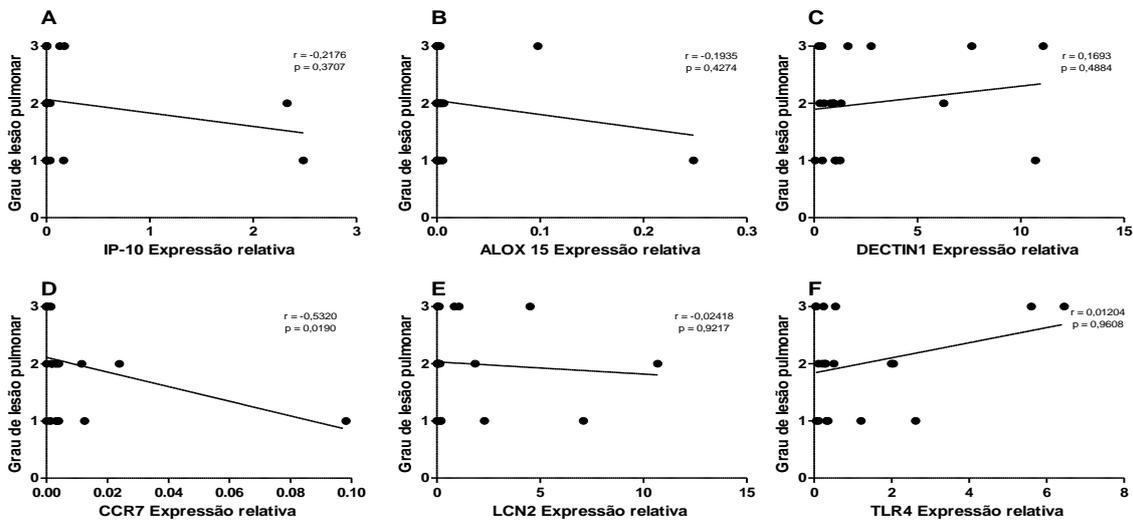


Figura 12. Correlação entre expressão gênica e gravidade da doença em pacientes com tuberculose. A lesão pulmonar foi classificada em três estágios em um teste duplo cego. O estágio 1 corresponde ao quadro clínico de menor gravidade, o estágio 2 é considerado moderado e o estágio 3 é considerado o quadro clínico mais grave. As expressões gênicas de A- IP10, B- DECTIN1, C- TLR4, D- CCR7, E- LCN2 e F- ALOX15 apresentadas pelos neutrófilos dos pacientes foram correlacionadas com o seu respectivo estágio de gravidade da tuberculose e analisadas através do teste de correlação de Spearman. Os valores de r^2 e p estão especificados em cada gráfico.

5.8 As diferenças no perfil de expressão genética dos neutrófilos durante as distintas fases de infecção

O perfil genético dos neutrófilos de pacientes com tuberculose pode dizer muito sobre como essas células estão atuando durante a infecção por Mtb. Contudo, os neutrófilos circulantes no sangue detectam os efeitos da infecção antes mesmo de migrarem para os tecidos e encontram com o patógeno. Assim os neutrófilos poderiam chegar ao local da infecção já polarizados por meio dos mediadores presentes no sangue dos pacientes infectados. Para simular esta situação *in vitro*, e avaliar os efeitos que os mediadores imunológicos presentes na circulação sanguínea podem exercer nos neutrófilos circulantes, estimulamos os neutrófilos de doadores saudáveis com o plasma dos pacientes que tiveram o estágio mais avançado da tuberculose.

A incubação de neutrófilos com o plasma de pacientes com TB induziu o aumento da expressão de TLR4, CCR7, IP-10 e ALOX 15 (Figura 13). No entanto, é interessante notar que nos pacientes com TB, em que essa estimulação é crônica ocorre uma alteração no perfil de expressão desses mesmos marcadores. De forma que, eles se encontram menos expressos. Por meio desse resultado é possível constatar as mudanças no comportamento dos neutrófilos e que a cada fase da tuberculose essas células podem apresentar uma diferente atuação.

Além disso, podemos observar uma diminuição na expressão de LCN2 e de DECTIN-1 quando os neutrófilos entram em contato com os mediadores imunológicos produzidos frente à infecção por Mtb. Esse padrão de supressão permanece mesmo quando a TB já está instalada.

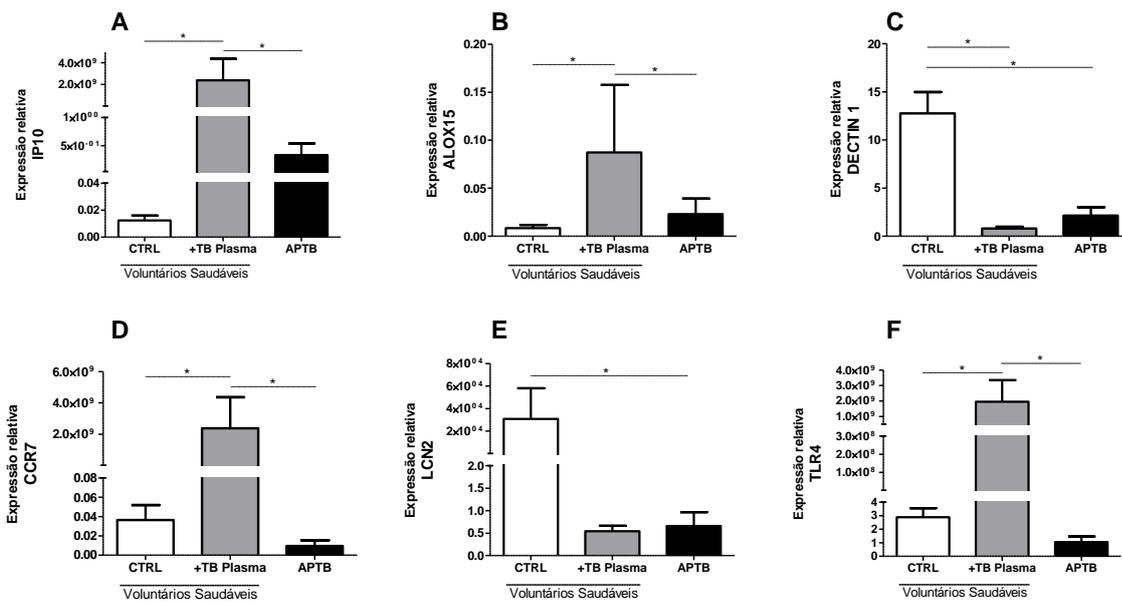


Figura 13. Expressão gênica de neutrófilos em diferentes tempos em uma infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Os neutrófilos de voluntários saudáveis foram incubados ou não com plasma de pacientes com tuberculose durante 4 horas e a expressão foi comparada com neutrófilos isolados de paciente com tuberculose ativa. Os experimentos foram analisados pelo teste não-paramétrico de Friedman, com significância $p < 0,05$. APTB: Pacientes Ativos com Tuberculose.

6. DISCUSSÃO

A tuberculose, embora em grande parte, uma doença curável, continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade atribuídas a doenças infecciosas em todo o mundo (O'garra *et al.*, 2013). Muitos estudos ao longo dos últimos anos vêm contribuindo para o maior conhecimento dessa infecção e ampliando as perspectivas de desenvolvimento de novos tratamentos, diagnósticos e vacinas. Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa contra a infecção pelo Mtb, a sua ativação pode influenciar a resposta imune do indivíduo, podendo levar ao desenvolvimento da forma latente ou a forma ativa da doença. Embora existam muitos estudos sobre o papel dessa célula na tuberculose, ainda persistem muitas divergências sobre como essa célula ajudaria no controle ou desenvolvimento da doença. Recentemente, alguns trabalhos vêm demonstrando que os neutrófilos podem apresentar polarização, de acordo com o seu microambiente, assim como já se observa em macrófagos (Fridlender *et al.*, 2009). A polarização e o desenvolvimento dos fenótipos N1 e N2 já observados no câncer poderiam ocorrer também na TB e participariam da determinação dos caminhos da infecção, que pode manifestar-se no hospedeiro como latente ou ativa.

A fim de observar a influência de diferentes estados de ativação dos neutrófilos na patogênese da tuberculose buscamos caracterizar os perfis N1 e N2. A Figura 4 A-F enfatiza claramente a diferença morfológica após 20 horas de estimulação com meios condicionados, principalmente no núcleo dos neutrófilos. Sagiv e colaboradores já haviam revelado a diferença morfológica dos subtipos de neutrófilos em estudos de câncer (Sagiv *et al.*, 2015). Assim, as imagens obtidas por meio do aumento de 450% da imagem original revelaram como os neutrófilos condicionados em nossos experimentos nos perfis N1 e N2 alteram sua morfologia (Figura 4-E e 4-F). Piccard e colaboradores já mostraram que os neutrófilos N1 apresentam núcleo segmentado e os do perfil N2, núcleos circulares (Piccard *et al.*, 2012) e nossos resultados corroboraram com esses achados. Entretanto, apenas a morfologia não é suficiente para se garantir que a estimulação provocou mudanças na fisiologia dessas células, para tanto, avaliamos a produção de espécies

reativas de oxigênio pelos N1 e N2. Na Figura 4-G fica evidente que as células foram polarizadas, uma vez que cada perfil celular atua de forma diferente à estimulação com PMA. Os neutrófilos N1 são capazes de liberar uma grande quantidade de EROs quando comparamos com o N2 e curiosamente tem o mesmo padrão fisiológico descrito por outros autores (Sagiv *et al.*, 2015) (Sionov *et al.*, 2015). Com estes testes podemos concluir que é possível promover a polarização dos neutrófilos *in vitro* pelas citocinas utilizadas e que estas células podem ser utilizadas em experimentos *in vitro* para a compreensão de como os diferentes perfis de diferenciação celular atuam na infecção por Mtb.

As citocinas liberadas por neutrófilos polarizados são muito importantes no momento da infecção, a partir da figura 6 podemos entender melhor por que muitos trabalhos revelam diferenças nas atividades realizadas por essas células. É bem descrito na literatura o importante papel das citocinas inflamatórias, tais como, IL-1 β , IFN- γ e IL-8, e é interessante notar como os neutrófilos N1 liberaram níveis elevados destas citocinas inflamatórias (Yamada *et al.*, 2000), (Flynn *et al.*, 1993), (Zhang *et al.*, 1995). Estudos recentes mostram que o excesso desse tipo de citocinas podem causar danos às células e prejudicar a resposta inflamatória (Garlanda *et al.*, 2007). Friedland et al demonstraram que os pacientes que morreram de tuberculose apresentaram altos níveis de IL-8 no sangue e que as células de tais pacientes não responderam bem a estímulos como o LPS (Friedland *et al.*, 1995). O excesso de citocinas inflamatórias liberadas pelos neutrófilos polarizados para o perfil N1, poderia prejudicar seu desempenho durante a infecção e causar mais danos teciduais ou até mesmo exaustão do sistema imune. Aqui, sugerimos que devido ao excesso de sinais inflamatórios os neutrófilos N1 não apresentaram um alto índice fagocítico e microbicida, contrariando as expectativas (Figura 7A).

Os neutrófilos previamente polarizados para o perfil N2 também produzem citocinas pró-inflamatórias quando infectados com Mtb, a polarização não inibiu esta produção. No entanto, estas células também produziram citocinas anti-inflamatórias tais como IL-4 e TGF- β , destacando que

após a infecção por Mtb os níveis de IL-4 se mostraram ainda maiores. As citocinas Th2 estão muito associadas com mau prognóstico da infecção, permitindo a sobrevivência das micobactérias, seu crescimento no local da infecção e até a sua disseminação (Howard and Zwilling, 1999), (North, 1998). Assim como observado para N1, o perfil de N2 não foi capaz apresentar uma atividade fagocítica e microbicida elevada (Figura 7A-B). Vários estudos têm demonstrado que os neutrófilos são capazes de fagocitar o Mtb (Infante-Duarte and Kamradt, 1999; Seiler *et al.*, 2000), no entanto ainda é controversa a sua capacidade de eliminá-lo (Lowe *et al.*, 2012).

O papel regulador das citocinas também tem sido bem explorado e atualmente sabe-se como é importante a regulação pelas citocinas anti-inflamatórias e como esse equilíbrio pode ajudar no sítio infeccioso (Surcel *et al.*, 1994; Infante-Duarte and Kamradt, 1999). Para entender como N1 e N2 poderiam ajudar as células residentes no local da infecção, após migrar através do endotélio, nós infectamos *in vitro* com Mtb os neutrófilos polarizados e adicionamos à cultura, a fração de células mononucleares do sangue periférico dos mesmos doadores. Comparando os grupos, os índices de fagocitose dos monócitos não foram alterados na presença das diferentes subpopulações de neutrófilos. No entanto, quando a atividade microbicida foi avaliada, foi possível afirmar que os mediadores liberados pelos neutrófilos N1 e N2 potencializaram a capacidade dos monócitos em eliminar a micobactéria.

As citocinas e possivelmente outros mediadores inflamatórios libertados por N1 ou até mesmo o contato célula-célula, aumentaram a capacidade dos monócitos de matar as micobactérias. De forma similar o balanço inflamatório contendo não só IL-8 e IL-1 β , mas também IL-4, ajudou os PBMCs a exercer a atividade microbicida. (Figura 9). Assim, o padrão de citocinas produzido por células polarizadas e infectadas é crucial para ajudar na interação com outras células e promover a atividade microbicida, visto que o neutrófilo sem qualquer estimulação não foi capaz de promover tal atividade. Com os resultados deste trabalho podemos dizer que muitos dos desacordos sobre o

papel dos neutrófilos possivelmente ocorre pelo perfil que as células apresentam no momento do estudo.

Mycobacterium tuberculosis é um patógeno intracelular não obrigatório, que vive no citoplasma das células infectadas ou no interstício do tecido. As formas mais graves da tuberculose estão relacionadas à maior disseminação dos bacilos no espaço extracelular (Dorhoi *et al.*, 2011). Uma resposta celular eficiente no combate aos patógenos extracelulares é a liberação das redes extracelulares dos neutrófilos, ou NET, que podem restringir o crescimento de patógenos, controlando a infecção (Brinkmann *et al.*, 2004). As NETs são formadas predominantemente por DNA bem como proteínas a partir dos grânulos primários, tais como elastase, catepsina G e mieloperoxidase. Também apresentam proteínas dos grânulos secundários como lactoferrina e gelatinase (Brinkmann *et al.*, 2004). Estas estruturas também podem ser formadas quando neutrófilos estão em contato com Mtb extracelular (Ramos-Kichik *et al.*, 2009). Aqui nós mostramos que Mtb é capaz de induzir NET nos grupos N0 e N1 (Figura 10). Curiosamente, não foi possível ver essas estruturas em neutrófilos N2, infectados por Mtb (Figura 10) ou mesmo estimulados por PMA, o controle positivo para a liberação de NET. Este resultado é esperado uma vez que a formação de NET está intimamente ligada à capacidade das células de produzir EROs (Nishinaka *et al.*, 2011; Keshari *et al.*, 2013). Conforme ilustrado na Figura 4-G, os neutrófilos N2 têm uma baixa produção de espécies reativas de oxigênio. Portanto, sugerimos aqui que o perfil N1 é capaz de capturar Mtb por NET, provavelmente induzido pela produção de EROs e citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-1 β e IL-8. Em contra partida N2 é incapaz de resolver a infecção extracelular, sendo mais eficiente na comunicação célula-célula, como visto nos ensaios de co-cultura.

Conhecendo o papel de N1 e N2 na luta contra Mtb *in vitro*, e considerando o papel dos neutrófilos na TB ativa, questionou-se correlacionar a gravidade da doença humana com os perfis de neutrófilos circulantes no sangue do paciente. A Figura 11 destaca a expressão gênica dos

neutrófilos provenientes do sangue periférico dos pacientes com tuberculose (APT_B), e as compara com as de voluntários do grupo controle (CTRL) que não apresentam doença ativa. TLR4 e LCN2 são receptores de membrana importantes na atividade pró-inflamatória contra Mtb (Abel *et al.*, 2002; Guglani *et al.*, 2012; Labonte *et al.*, 2014). O gene LCN2 está associado ao perfil inflamatório (Zhang *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2013), auxiliando no controle da infecção pela inibição do crescimento bacteriano (Saiga *et al.*, 2011). Nos neutrófilos LCN2 foi previamente identificado nos seus grânulos (Borregaard *et al.*, 2007). Aqui, demonstramos que os neutrófilos de APT_B apresentam diminuição na expressão de TLR4 e LCN2 quando comparados com neutrófilos do grupo controle.

A Dectina-1 é um PRR que assim como o TLR2, reconhece Mtb e promove uma sinalização que favorece a resposta inflamatória, visando a resolução da TB (Killick *et al.*, 2013). Na resposta imune contra Mtb a presença de Dectina-1 está associada ao perfil inflamatório promovendo a resposta Th1/Th17 (Zenaro *et al.*, 2009). Os neutrófilos expressam Dectina-1 para detectar os patógenos e, em conformidade com o seu tamanho, induzir fagocitose ou libertação de NET, na ausência de expressão de Dectina-1, a NET é a resposta mais frequente (Branzk *et al.*, 2014). Curiosamente, os neutrófilos dos pacientes APT_B recrutados para este estudo mostraram uma diminuição na expressão de Dectina-1. Os três genes que são menos expressos em nosso estudo (Dectin1, TLR4 e LCN2) ajudam no controle da infecção e podem interagir para aumentar a resposta imune (Ferwerda *et al.*, 2008; Saiga *et al.*, 2011; Röszer, 2015). Este resultado sugere uma supressão da resposta pró-inflamatória em neutrófilos de pacientes com tuberculose, que pode representar a gravidade da TB.

Outro gene aqui avaliado foi CCR7, que permaneceu inalterado em pacientes infectados e IP10 que estava ligeiramente mais expresso, indicando que estas células têm a capacidade de migrar para órgãos linfóides secundários, podendo facilitar a ativação de células T. CCR7 é um importante receptor que está intimamente relacionado com a migração de neutrófilos para os linfonodos, onde

podem auxiliar junto às células dendríticas na ativação de células T. Além disso, estudos em camundongos destacam a importância deste receptor, uma vez que os animais que apresentaram deficiência em CCR7 têm maior dispersão de Mtb (Kahnert *et al.*, 2007; Pokkali and Das, 2009; Beauvillain *et al.*, 2011). Com a Figura 12 a importância do CCR7 fica em destaque, visto que este foi o único gene que revelou uma correlação negativa com a progressão da tuberculose. Assim, sugerimos que os neutrófilos comprometidos com a migração para os linfonodos estão relacionados com a menor gravidade da tuberculose.

Diversos trabalhos com macrófagos já exploraram que a ativação do perfil M2 está relacionada ao aumento da expressão de ALOX15 (Gordon and Martinez, 2010; Sica, A. and Mantovani, A., 2012). Pello e colaboradores demonstraram que a IL-4 pode induzir a atividade de c-Myc em macrófagos humanos, que por sua vez controla a ativação de genes relacionados ao perfil M2, como ALOX15 (Pello *et al.*, 2012). Curiosamente, o grupo N2 mostra um aumento na produção de IL-4 (figura 6), especialmente quando estimulado por Mtb. Além disso, a expressão gênica de neutrófilos com perfil N2 (Figura 5) também revelou um sutil aumento de ALOX15, bem como células de pacientes com tuberculose (Figura 11). Embora não seja possível assegurar que este aumento na expressão de ALOX15 é significativo, é uma indicação biológica de que estas alterações que ocorrem com os neutrófilos N2 são semelhantes às apresentadas pelos macrófagos M2. Um resultado antagônico, ocorre com a expressão de IP10. Esta quimiocina está relacionada com a ativação do perfil M1 em macrófagos (Mantovani *et al.*, 2004) e também revela um sutil aumento na expressão em neutrófilos de pacientes com tuberculose (figura 11). Este resultado reforça a ideia de que os neutrófilos, embora polarizados, apresentam um equilíbrio entre as características descritas como pró e anti inflamatórias. Além disso, o fato de que os neutrófilos expressam ALOX15 e IP10 torna possível explorar melhor como a modulação diferenciada desses genes podem ajudar a caracterizar diferentes perfis celulares.

A partir dessas observações foi possível fazer um paralelo com a expressão gênica dos neutrófilos polarizados *in vitro* com os obtidos a partir dos pacientes com tuberculose ativa. Os resultados nos permitem sugerir que os neutrófilos dos pacientes com doença ativa têm um perfil muito similar ao dos neutrófilos polarizados para o perfil N2. Dessa forma, com os neutrófilos produzindo mais citocinas com perfil Th2, como TGF- β , sendo incapazes de liberar NET's e ainda aumentando a expressão de genes como ALOX-15 e IP-10, a soma desses fatores pode ser prejudicial no controle de Mtb. No outro cenário, os neutrófilos N1, com perfil de expressão gênica relacionado à proteção contra a TB, a presença de Dectina1, LCN2, a produção de citocinas pró-inflamatórias, a habilidade de potencializar a atividade microbida de micobactérias fagocitadas e alta capacidade de liberação de NET, estariam mais associados a um perfil protetor em indivíduos infectados. Mesmo com o N2 sendo capaz de estimular uma resposta microbida quando co-cultivado com monócitos, no hospedeiro, isto não poderia ser suficiente para controlar as bactérias disseminadas pelos pulmões.

Além de compreender qual subpopulação é mais abundante em pacientes com tuberculose, incubamos neutrófilos de indivíduos não infectados com plasma de pacientes com tuberculose. Aqui buscamos investigar os efeitos dos mediadores imunológicos circulantes, induzidos pela infecção, sobre a polarização das células. Dessa forma, observamos a expressão gênica de neutrófilos saudáveis e comparamos o mesmo parâmetro com os neutrófilos incubados com plasma de pacientes com TB e com neutrófilos de pacientes com tuberculose ativa (Figura 13). Essa é uma tentativa de mimetizar a ativação de novas células liberadas pela medula óssea para o sistema circulatório e observar o seu primeiro contato com as citocinas e quimiocinas já produzidas como resultado da infecção. A figura complementar S.1 revela as citocinas e quimiocinas presentes no plasma dos pacientes aos quais as células foram submetidas e é interessante enfatizar o aumento de RANTES. Esta quimioquina é conhecida por promover a atração de neutrófilos para o sítio infeccioso (Pan *et al.*, 2000). Além disso, o perfil de expressão gênica de neutrófilos de pacientes

com tuberculose representa o estágio tardio da infecção, no qual os neutrófilos são constantemente estimulados no sangue pelo ambiente inflamatório causado pela infecção.

A expressão de LCN2 e Dectina-1 diminui significativamente nos estágios precoce e tardio da estimulação quando comparada com os neutrófilos de voluntários saudáveis. Este cenário é semelhante ao perfil observado pela subpopulação N2 sugerindo que nos casos de tuberculose há aumento deste grupo celular. Esta hipótese ganha força quando observamos a capacidade destas células em alterar o perfil de expressão gênica no caso de CCR7, TLR4, IP-10 e ALOX15. É importante destacar o aumento da expressão de CCR7 na estimulação aguda, uma vez que pode atuar como sinal de migração para tecido danificado (Yamashita *et al.*, 2009). Com outras palavras, os mediadores imunológicos presentes no plasma sinalizam uma perturbação no organismo e ativam sinais de migração. Nos neutrófilos, o CCR7 tem um papel muito característico que é sinalizar a migração dessas células para os órgãos linfóides (Beauvillain *et al.*, 2011). Este sinal pode ser determinante para o controle da infecção, uma vez que os neutrófilos que entram em contato com o sítio infeccioso migram para os linfonodos podendo atuar como apresentadores e auxiliar na ativação da resposta imunológica contra *Mtb*. Reforçando essa hipótese, quando os dados da expressão gênica observada em células de pacientes foram correlacionados com a gravidade da doença foi possível constatar que a diminuição de CCR7 está correlacionada com a gravidade da doença.

É interessante notar que a estimulação aguda dos neutrófilos com o plasma de TB representou uma expressão aumentada de TLR4, uma resposta inflamatória característica em infecções por *Mtb* (Means *et al.*, 1999; Abel *et al.*, 2002), e que pode auxiliar na liberação de citocinas como a IL-8 (Godaly and Young, 2005), que por sua vez aumentam o recrutamento de neutrófilos (Smart and Casale, 1994; Monin and Khader, 2014). No entanto, tais células após estimulação crônica, alteram sua expressão gênica e diminuem a expressão deste gene que pode exacerbar a resposta inflamatória e causar danos nos tecidos (Zager, 2013; Morosanova *et al.*,

2016). Esta ideia é corroborada pela correlação entre a expressão do gene TLR4 e a progressão da tuberculose. O resultado expresso na Figura 12 é destacado pela Figura Complementar S.2, em que podemos observar que o aumento da expressão de TLR4 possui uma correlação positiva com uma maior lesão causada pela tuberculose. Com todos esses achados concluímos que N2 está mais relacionado com a forma mais grave da doença, impedindo a resolução ideal da infecção que estaria associada ao perfil N1.

Por fim, este estudo suporta a plasticidade dos neutrófilos, mostrando que diferentes estímulos e microambientes podem polarizar essas células e alterar sua morfologia e fisiologia. Também desvendamos que os subtipos de neutrófilos desempenham diferentes respostas contra *Mtb*, o que pode explicar o caráter dual dessas células na TB que, por anos, é reforçada em vários estudos. No entanto, nosso trabalho encontra um fator limitante. Para que pudéssemos afirmar de fato esse papel dual dos neutrófilos seria interessante ter acesso aos neutrófilos pulmonares de pacientes com tuberculose bem como de voluntários saudáveis. Com a caracterização dessas células seria possível traçar com mais precisão qual perfil celular é mais abundante na infecção, bem como, buscar correlações entre a presença de N1 ou N2 com a progressão da TB.

7. CONCLUSÃO

Conclusão

Esse estudo revelou que é possível promover a polarização dos neutrófilos, por meio de meios condicionados, além disso, mostramos como os perfis N1 e N2 desempenham diferentes respostas em uma infecção por Mtb. De forma que, N2 apresentou uma maior produção de citocinas anti-inflamatórias, e que apesar de poder auxiliar na morte de micobactérias previamente fagocitadas por monócitos esse tipo celular é incapaz de liberar NET. Já os neutrófilos N1 apresentaram uma elevada produção de ROS, IL-1 β , IFN- γ e IL-8, todos esses mediadores potencializaram a atividade microbicida, além de proporcionar a maior liberação de NET.

Por meio da expressão gênica foi possível caracterizar os perfis N1 e N2 e traçar qual é mais abundante em pacientes com tuberculose, bem como fazer correlações com a gravidade da doença. O perfil N2 apresentou aumento na expressão de genes como ALOX-15 e IP-10, além da diminuição de genes importantes para o controle da TB. A caracterização gênica de N2 é muito similar ao perfil de expressão gênica amostrada pelos pacientes com tuberculose, devido ao aumento de IP-10, ALOX15, bem como a diminuição de DECTIN-1 e LCN2. Essas semelhanças nos permite inferir que N2 é mais abundante durante a infecção. Em contrapartida o perfil gênico de N1, com o aumento de Dectin1 e LCN2 está mais relacionada com a proteção contra a TB. Por fim, a correlação entre os dados clínicos e a expressão gênica dos neutrófilos revelou uma correlação negativa com a gravidade da doença, no caso de CCR7 e outra correlação positiva quando avaliado a expressão de TLR4.

Nosso trabalho mostrou que os neutrófilos podem se polarizar de acordo com o microambiente e que os perfis N1 e N2 possuem diferentes atuações na infecção por Mtb. De forma que, N1 está relacionado com o controle e resolução da infecção, enquanto que a presença de N2 sinaliza um pior prognóstico. Além disso, mostramos que os neutrófilos N1 e N2 são alvos promissores para o entendimento do desenvolvimento da tuberculose e até de outras doenças.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAKAY, O. et al. The relationship between inflammatory marker levels and pulmonary tuberculosis severity. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 691-6, Apr 2015. ISSN 1573-2576. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028104> >.
- ABEL, B. et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3155-62, Sep 2002. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218133> >.
- AMULIC, B.; HAYES, G. Neutrophil extracellular traps. **Curr Biol**, v. 21, n. 9, p. R297-8, May 2011. ISSN 1879-0445. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21549944> >.
- ASHENAFI, S. et al. Progression of clinical tuberculosis is associated with a Th2 immune response signature in combination with elevated levels of SOCS3. **Clin Immunol**, v. 151, n. 2, p. 84-99, Apr 2014. ISSN 1521-7035. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24584041> >.
- BARKER, L. F. et al. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 331-8, Jun 2009. ISSN 1879-0372. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505813> >.
- BARNES, P. F. et al. Predictors of short-term prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 158, n. 2, p. 366-71, Aug 1988. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3403993> >.
- BEAUVILLAIN, C. et al. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1196-204, Jan 2011. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051556> >.
- BIANCHI, M. et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2619-22, Sep 2009. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541821> >.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 889-96, Oct 2010. ISSN 1529-2916. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856220> >.
- BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol**, v. 28, n. 8, p. 340-5, Aug 2007. ISSN 1471-4906. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627888> >.
- BRAIAN, C.; HOGEA, V.; STENDAHL, O. Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. **J Innate Immun**, v. 5, n. 6, p. 591-602, 2013. ISSN 1662-8128. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23635526> >.

BRANZK, N. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nat Immunol**, v. 15, n. 11, p. 1017-25, Nov 2014. ISSN 1529-2916. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217981> >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 2004. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782> >.

BROWN, A. E.; HOLZER, T. J.; ANDERSEN, B. R. Capacity of human neutrophils to kill Mycobacterium tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 156, n. 6, p. 985-9, Dec 1987. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2824628> >.

COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology**, v. 103, n. 1, p. 1-9, May 2001. ISSN 0019-2805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11380686> >.

D'AVILA, H. et al. Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 12, p. 2589-604, Dec 2008. ISSN 1462-5822 (Electronic). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18771558 >.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respir Med**, v. 100, n. 11, p. 1862-70, Nov 2006. ISSN 0954-6111. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949809> >.

DHEDA, K. et al. In vivo and in vitro studies of a novel cytokine, interleukin 4 delta 2, in pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 4, p. 501-508, AUG 15 2005 2005. ISSN 1073-449X.

DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. Perspectives on host adaptation in response to Mycobacterium tuberculosis: modulation of inflammation. **Semin Immunol**, v. 26, n. 6, p. 533-42, Dec 2014. ISSN 1096-3618. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453228> >.

DORHOI, A.; REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 235-51, Mar 2011. ISSN 1600-065X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349097> >.

DRESCHER, B.; BAI, F. Neutrophil in viral infections, friend or foe? **Virus Res**, v. 171, n. 1, p. 1-7, Jan 2013. ISSN 1872-7492. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178588> >.

ERUSLANOV, E. B. et al. Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. **Infect Immun**, v. 73, n. 3, p. 1744-53, Mar 2005. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731075> >.

- EUM, S. Y. et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. **Chest**, v. 137, n. 1, p. 122-8, Jan 2010. ISSN 1931-3543. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19749004> >.
- FERWERDA, G. et al. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2058-66, Oct 2008. ISSN 1462-5822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18549457> >.
- FLYNN, J. L. et al. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **J Exp Med**, v. 178, n. 6, p. 2249-54, Dec 1993. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504064> >.
- FLYNN, J. L.; ERNST, J. D. Immune responses in tuberculosis. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 4, p. 432-6, Aug 2000. ISSN 0952-7915. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899019> >.
- FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183-94, Sep 2009. ISSN 1878-3686. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732719> >.
- FRIEDLAND, J. S. et al. Inhibition of ex vivo proinflammatory cytokine secretion in fatal Mycobacterium tuberculosis infection. **Clin Exp Immunol**, v. 100, n. 2, p. 233-8, May 1995. ISSN 0009-9104. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7743661> >.
- FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v. 176, n. 2, p. 231-41, Jan 2007. ISSN 0021-9525. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210947> >.
- GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 3, p. 162-74, Mar 2009. ISSN 1474-1741. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197294> >.
- GANDHI, N. R. et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. **Lancet**, v. 375, n. 9728, p. 1830-43, May 2010. ISSN 1474-547X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488523> >.
- GARLANDA, C. et al. Damping excessive inflammation and tissue damage in Mycobacterium tuberculosis infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. **J Immunol**, v. 179, n. 5, p. 3119-25, Sep 2007. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709526> >.
- GODALY, G.; YOUNG, D. B. Mycobacterium bovis bacille Calmette Guerin infection of human neutrophils induces CXCL8 secretion by MyD88-dependent TLR2 and TLR4 activation. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 591-601, Apr 2005. ISSN 1462-5814. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760459> >.

- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, May 2010. ISSN 1097-4180. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510870> >.
- GRANICH, R. et al. Prevention of tuberculosis in people living with HIV. **Clin Infect Dis**, v. 50 Suppl 3, p. S215-22, May 2010. ISSN 1537-6591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397951> >.
- GUGLANI, L. et al. Lipocalin 2 regulates inflammation during pulmonary mycobacterial infections. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50052, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23185529> >.
- GUTIERREZ, M. C. et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog**, v. 1, n. 1, p. e5, Sep 2005. ISSN 1553-7366. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16201017> >.
- HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 90, n. 4, p. 607-17, Apr 1997. ISSN 0019-2805. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9176116> >.
- HERSHKOVITZ, I. et al. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3426, 2008. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923677> >.
- HOWARD, A. D.; ZWILLING, B. S. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. **Clin Exp Immunol**, v. 115, n. 3, p. 428-34, Mar 1999. ISSN 0009-9104. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10193414> >.
- INFANTE-DUARTE, C.; KAMRADT, T. Th1/Th2 balance in infection. **Springer Semin Immunopathol**, v. 21, n. 3, p. 317-38, 1999. ISSN 0344-4325. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666776> >.
- JANG, E. et al. Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization. **FASEB J**, v. 27, n. 3, p. 1176-90, Mar 2013. ISSN 1530-6860. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207546> >.
- KAHNERT, A. et al. Mycobacterium tuberculosis triggers formation of lymphoid structure in murine lungs. **J Infect Dis**, v. 195, n. 1, p. 46-54, Jan 2007. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17152008> >.
- KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20-30, Oct 2001. ISSN 1474-1733. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905811> >.

KELLER, C. et al. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. **Infect Immun**, v. 74, n. 7, p. 4295-309, Jul 2006. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790804> >.

KESHARI, R. S. et al. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 3, p. 532-40, Mar 2013. ISSN 1097-4644. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22961925> >.

KILLICK, K. E. et al. Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 9, p. 1484-95, Sep 2013. ISSN 1462-5822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795683> >.

KIRCHNER, T. et al. The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 849136, 2012. ISSN 1466-1861. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481865> >.

LABONTE, A. C.; TOSELLO-TRAMPONT, A. C.; HAHN, Y. S. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. **Mol Cells**, v. 37, n. 4, p. 275-85, Apr 2014. ISSN 0219-1032. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625576> >.

LOWE, D. M. et al. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? **Trends Immunol**, v. 33, n. 1, p. 14-25, Jan 2012. ISSN 1471-4981. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094048> >.

LUGO-VILLARINO, G. et al. Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV. **Front Immunol**, v. 2, p. 43, 2011. ISSN 1664-3224. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566833> >.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, Aug 2011. ISSN 1474-1741. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785456> >.

_____. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004. ISSN 1471-4906. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839> >.

MARZO, E. et al. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 94, n. 1, p. 55-64, Jan 2014. ISSN 1873-281X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291066> >.

MEANS, T. K. et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 163, n. 7, p. 3920-7, Oct 1999. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490993> >.

- MINISTÉRIO_DA_SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>. 2013. Accessed on: 03/01/2013.
- MOHAMMED, B. M. et al. Vitamin C: a novel regulator of neutrophil extracellular trap formation. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 3131-51, Aug 2013. ISSN 2072-6643. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23939536> >.
- MONIN, L.; KHADER, S. A. Chemokines in tuberculosis: the good, the bad and the ugly. **Semin Immunol**, v. 26, n. 6, p. 552-8, Dec 2014. ISSN 1096-3618. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25444549> >.
- MOROSANOVA, M. A. et al. Mechanisms of Inflammatory Injury of Renal Tubular Cells in a Cellular Model of Pyelonephritis. **Biochemistry (Mosc)**, v. 81, n. 11, p. 1240-1250, Nov 2016. ISSN 1608-3040. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27914450> >.
- MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618-31, Aug 2008. ISSN 1474-1768. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633355> >.
- NANDI, B.; BEHAR, S. M. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. **J Exp Med**, v. 208, n. 11, p. 2251-62, Oct 2011. ISSN 1540-9538. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21967766> >.
- NISHINAKA, Y. et al. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 413, n. 1, p. 75-9, Sep 2011. ISSN 1090-2104. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871447> >.
- NORTH, R. J. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. **Clin Exp Immunol**, v. 113, n. 1, p. 55-8, Jul 1998. ISSN 0009-9104. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697983> >.
- O'GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 475-527, 2013. ISSN 1545-3278. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516984> >.
- PAN, Z. Z. et al. Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, n. 4, p. L658-66, Oct 2000. ISSN 1040-0605. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11000125> >.
- PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v. 191, n. 3, p. 677-91, Nov 2010. ISSN 1540-8140. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20974816> >.

- PELLO, O. M. et al. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 411-21, Jan 2012. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067385> >.
- PERSKVIST, N. et al. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. **J Immunol**, v. 168, n. 12, p. 6358-65, Jun 2002. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055253> >.
- PICCARD, H.; MUSCHEL, R. J.; OPDENAKKER, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 82, n. 3, p. 296-309, Jun 2012. ISSN 1879-0461. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798756> >.
- POKKALI, S.; DAS, S. D. Augmented chemokine levels and chemokine receptor expression on immune cells during pulmonary tuberculosis. **Hum Immunol**, v. 70, n. 2, p. 110-5, Feb 2009. ISSN 1879-1166. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100801> >.
- RAMOS-KICHIK, V. et al. Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 89, n. 1, p. 29-37, Jan 2009. ISSN 1873-281X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056316> >.
- ROTH, A. E. et al. Beneficial non-targeted effects of BCG--ethical implications for the coming introduction of new TB vaccines. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 86, n. 6, p. 397-403, Nov 2006. ISSN 1472-9792 (Print) 1472-9792 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901755> >.
- RÓSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 816460, 2015. ISSN 1466-1861. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26089604> >.
- SAGIV, J. Y. et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. **Cell Rep**, v. 10, n. 4, p. 562-73, Feb 2015. ISSN 2211-1247. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25620698> >.
- SAIGA, H.; SHIMADA, Y.; TAKEDA, K. Innate immune effectors in mycobacterial infection. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, p. 347594, 2011. ISSN 1740-2530. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21274449> >.
- SAÚDE, M. D. Plano Estratégico para o Controle da Tuberculose, Brasil 2007-2015., http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=927&Itemid=965, 2006. Accessed on: 27/03/2017.

_____. Tuberculose. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/tuberculose>, 2017. Accessed on: 27/03/2017.

SEILER, P. et al. Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis**, v. 181, n. 2, p. 671-80, Feb 2000. ISSN 0022-1899. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669354> >.

SETIA, M. S. et al. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 3, p. 162-70, Mar 2006. ISSN 1473-3099. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500597> >.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, v. 122, n. 3, p. 787-95, Mar 2012. ISSN 1558-8238. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378047> >.

_____. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-795, MAR 2012 2012. ISSN 0021-9738.

SIONOV, R. V.; FRIDLENDER, Z. G.; GRANOT, Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenviron**, v. 8, n. 3, p. 125-58, Dec 2015. ISSN 1875-2292. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895166> >.

SMART, S. J.; CASALE, T. B. TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. **Am J Physiol**, v. 266, n. 3 Pt 1, p. L238-45, Mar 1994. ISSN 0002-9513. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8166294> >.

SURCEL, H. M. et al. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. **Immunology**, v. 81, n. 2, p. 171-6, Feb 1994. ISSN 0019-2805. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8157267> >.

SVENSON, S. et al. Towards new tuberculosis vaccines. **Hum Vaccin**, v. 6, n. 4, p. 309-17, Apr 2010. ISSN 1554-8619. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372087> >.

TAILLEUX, L. et al. How is the phagocyte lectin keyboard played? Master class lesson by *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 259-63, Jun 2003. ISSN 0966-842X. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823942> >.

VOROBEVA, N. V.; PINEGIN, B. V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 208-19, Feb 2016. ISSN 1878-3279. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26371849> >.

WHO, W. H. O. Global tuberculosis report. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf>, 2016.

- YAMADA, H. et al. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 759-67, May 2000. ISSN 0023-6837. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10830786> >.
- YAMASHITA, M. et al. Macrophages participate in lymphangiogenesis in idiopathic diffuse alveolar damage through CCL19-CCR7 signal. **Hum Pathol**, v. 40, n. 11, p. 1553-63, Nov 2009. ISSN 1532-8392. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540558> >.
- ZAGER, R. A. 'Biologic memory' in response to acute kidney injury: cytoresistance, toll-like receptor hyper-responsiveness and the onset of progressive renal disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 28, n. 8, p. 1985-93, Aug 2013. ISSN 1460-2385. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23761460> >.
- ZENARO, E.; DONINI, M.; DUSI, S. Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 6, p. 1393-401, Dec 2009. ISSN 1938-3673. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19773555> >.
- ZHANG, J. et al. The role of lipocalin 2 in the regulation of inflammation in adipocytes and macrophages. **Mol Endocrinol**, v. 22, n. 6, p. 1416-26, Jun 2008. ISSN 0888-8809. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292240> >.
- ZHANG, Y. et al. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to Mycobacterium tuberculosis and its components. **J Clin Invest**, v. 95, n. 2, p. 586-92, Feb 1995. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7860742> >.
- ZHU, L. M. et al. Multidrug-resistant tuberculosis is associated with low plasma concentrations of human neutrophil peptides 1-3. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 15, n. 3, p. 369-74, Mar 2011. ISSN 1815-7920 (Electronic) 1027-3719 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333105> >.
- ZINK, A. et al. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. **J Med Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 355-66, Apr 2001. ISSN 0022-2615. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289521> >.

9. FIGURAS SUPLEMENTARES

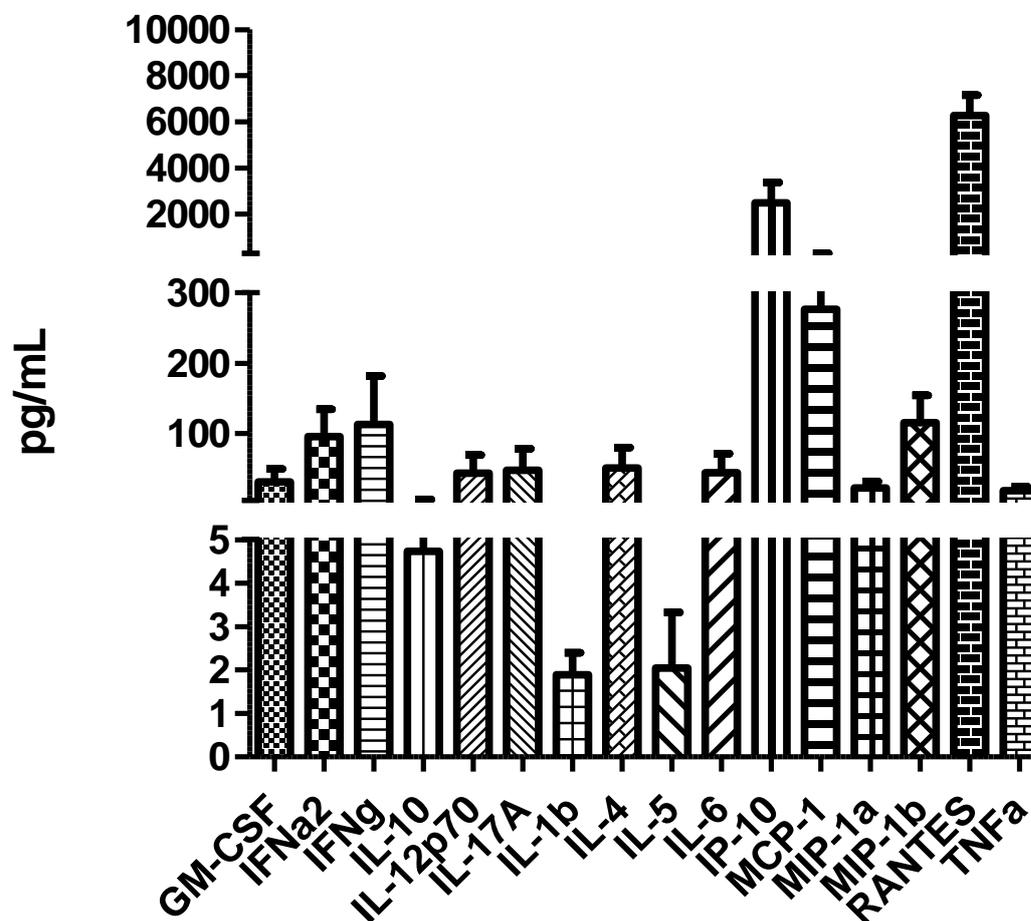


Figura S1: Quantificação de citocinas e quimiocinas presentes no plasma de pacientes com tuberculose. O plasma foi separado por centrifugação com sangue total; As quimiocinas e citocinas foram doseadas através do kit MILLIPLEX® MAP Cytokine / Chemokine; Millipore®.

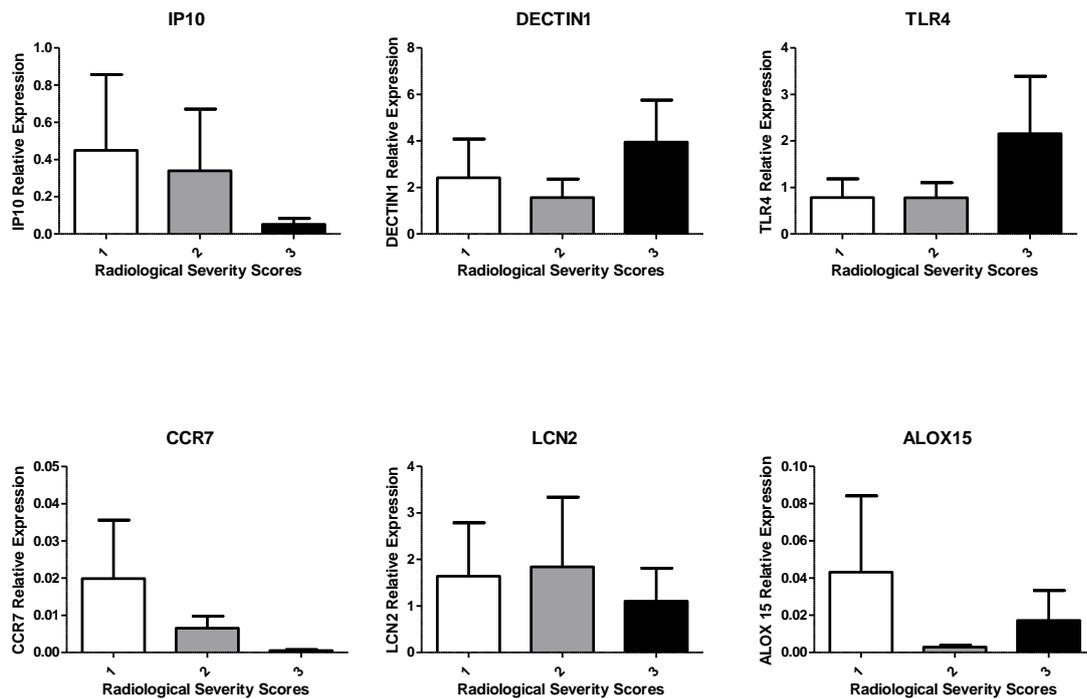
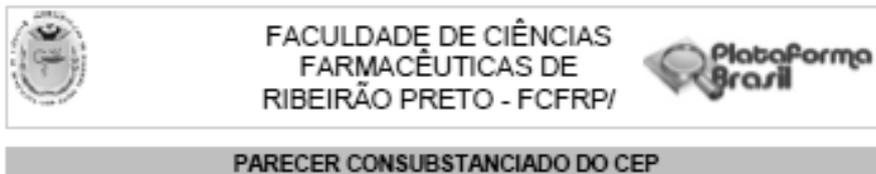


Figura S2: Correlação entre a gravidade da doença tuberculosa em pacientes com tuberculose e a expressão gênica. Este gráfico destaca como a expressão gênica está em cada estágio da tuberculose. A lesão pulmonar foi classificada em três estágios em um teste duplo-cego. O estágio 1 corresponde a lesões mínimas, o estágio 2 é considerado moderado e o estágio 3, avançado. Os experimentos foram analisados pelo teste não-paramétrico de Friedman, com significância $p < 0,05$.

10. ANEXOS

Anexo I

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Caracterização da atividade microbicida e controle da infecção pelo Mycobacterium tuberculosis por neutrófilos polarizados nos perfis N1 e N2

Pesquisador: Priscilla Mariane Cardoso Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44390815.3.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.124.058

Data da Relatoria: 26/05/2015

Apresentação do Projeto:

-

Objetivo da Pesquisa:

-

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

-

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

-

Recomendações:

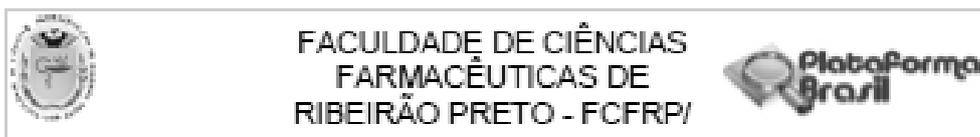
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências apontadas no parecer consubstanciado anterior foram atendidas. Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida do café s/n°
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4892 E-mail: cep@fcrp.usp.br



Continuação do Parecer 1.124.059

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado ad referendum do CEP/FCFRP em 25.06.2015. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercomência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, Item IV.5, letra d), o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". Sugerimos que o TCLE seja apresentado ao sujeito da pesquisa em documento impresso frente e verso.

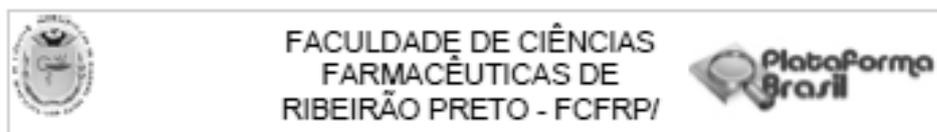
RIBEIRÃO PRETO, 25 de Junho de 2015

Assinado por:

Glenn Mara Marzocchi Machado
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefones: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4892 E-mail: cep@fcfp.usp.br

Anexo II

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Caracterização da atividade microbicida e controle da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* por neutrófilos polarizados nos perfis N1 e N2

Pesquisador: Priscilla Mariane Cardoso Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44390815.3.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.124.058

Data da Relatoria: 26/06/2015

Apresentação do Projeto:

–

Objetivo da Pesquisa:

–

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

–

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

–

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

–

Recomendações:

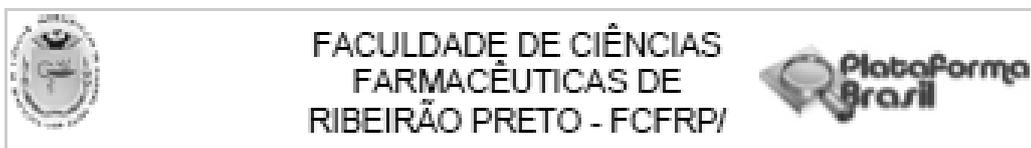
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências apontadas no parecer consubstanciado anterior foram atendidas. Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida do café s/n°
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4892 E-mail: cep@fotp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.134.050

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado ad referendum do CEP/FCFRP em 25.06.2015. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercomência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, Item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". Sugerimos que o TCLE seja apresentado ao sujeito da pesquisa em documento impresso frente e verso.

RIBEIRÃO PRETO, 25 de Junho de 2015

Assinado por:

Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador)

Anexo III

Termo de Consentimento

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo controle PPD -: negativos para o teste cutâneo com PPD; e Grupo Infecção latente PPD +: caracterizados por teste cutâneo positivo e ausência de história prévia de TB ativa

NOME DA PESQUISA: "Análise da expressão gênica de neutrófilos provenientes do sangue periférico de pacientes com tuberculose".

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Priscilla Mariane Cardoso Silva

Prof. Dra. Fabiani Gal Frantz

Gostaríamos de convidá-lo a participar desta pesquisa que é desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. Este trabalho tem com o objetivo avaliar a ativação de diferentes tipos de neutrófilos, que são as células do sangue essenciais para a defesa do corpo durante a infecção por micróbios. A sua participação é voluntária e não obrigatória. Para participar, é necessário ler com atenção este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento em duas vias, uma para você e outra para nós pesquisadores.

O que são neutrófilos?

Os neutrófilos são células do sistema imune que atuam na defesa contra micróbios invasores.

Como iremos avaliar suas células?

Utilizaremos as células do seu sangue, os neutrófilos, e iremos avaliar a ativação dessa célula.

O estudo da função do neutrófilo é importante porque essas células ajudam na defesa do organismo contra micróbios invasores, e o entendimento do funcionamento dessa célula poderia até ajudar no diagnóstico ou tratamento de doenças como a tuberculose.

Como você, doador, vai participar da pesquisa?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 10 mL de sangue, que corresponde a 1 colher de sopa. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde, será utilizada somente para esta pesquisa e em caso de sobra, o sangue será jogado fora. A coleta de sangue será realizada em sala apropriada no Laboratório de Imunologia e Epigenética (LIME) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, apenas uma vez no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado. A pesquisa não acarreta nenhum prejuízo a você doador, sendo os riscos apenas aqueles ligados à coleta de sangue, tais como, dor da picada, formação de hematomas.

Por que esta pesquisa está sendo feita?

Esta pesquisa trará benefícios para entender como estão as células de defesa de um indivíduo quando em uma infecção que é gerada pelo micróbico *Mycobacterium tuberculosis*. O teste será realizado em laboratório com os neutrófilos dos indivíduos doadores, separados do sangue. Sendo assim, os participantes desta pesquisa não sofrerão nenhum risco de contaminação. A coleta de sangue deverá ser feita em indivíduos, de ambos os gêneros, com idade entre 18 e 60 anos.

Sua participação será muito importante para a realização do estudo, compondo o grupo de pessoas que não apresentam a inflamação causada pelo micróbico *Mycobacterium tuberculosis*. Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, você poderá desistir de participar a qualquer momento, ou nos procurar para tirar qualquer dúvida, basta avisar os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones ou contatos que aparecem no final deste documento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Priscilla Marlane Cardoso Silva (emilly@usp.br), Dra. Fabiani Gal Frantz (frantz@fctfp.usp.br) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP/ cep@fctfp.usp.br). Por telefone: (16) 3315-0241 (laboratório USP), (16) 98160-9934 (celular Priscilla), (16) 3315-4213 (Comitê de Ética em Pesquisa).

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 10 mL do meu sangue da veia do braço para a realização de pesquisa. Foi informado sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Foi informado também que a finalidade dessa pesquisa é entender como os neutrófilos, célula de defesa do corpo, funcionam, quando em contato com o micróbio, *Mycobacterium tuberculosis*.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do doador de sangue – Registro

Priscilla M. Cardoso Silva/Prof. Dra. Fabiani G. Frantz

(Pesquisadores Responsáveis)

Termo de Consentimento

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo Tuberculose ativa não tratada

NOME DA PESQUISA: "Análise da expressão gênica de neutrófilos provenientes do sangue periférico de pacientes com tuberculose".

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Priscilla Mariane Cardoso Silva

Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz

Gostaríamos de convidá-lo a participar desta pesquisa que é desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. Este trabalho tem com o objetivo avaliar a ativação de diferentes tipos de neutrófilos, que são as células do sangue essenciais para a defesa do corpo durante a infecção por micróbios. A sua participação é voluntária e não obrigatória. Para participar, é necessário ler com atenção este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento em duas vias, uma para você e outra para nós pesquisadores.

O que são neutrófilos?

Os neutrófilos são células do sistema imune que atuam na defesa contra micróbios invasores.

Como iremos avaliar suas células?

Utilizaremos as células do seu sangue, os neutrófilos, e iremos avaliar a ativação dessa célula durante a infecção que é gerada pelo micróbio, *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose. Além disso, queremos saber a capacidade dos neutrófilos de produzir substâncias que matam os micróbios.

O estudo da função do neutrófilo é importante porque essas células ajudam na defesa do organismo contra micróbios invasores, e o entendimento do funcionamento dessa célula poderia até ajudar no diagnóstico ou tratamento da tuberculose.

Como você, doador, vai participar da pesquisa?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 10 mL de sangue, que corresponde a 1 colher de sopa. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde, será utilizada somente para esta pesquisa e em caso de sobra, o sangue será jogado fora. A coleta de sangue será realizada em sala apropriada na Unidade de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI) do HC da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, apenas uma vez no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado. A pesquisa não acarreta nenhum prejuízo a você doador, sendo os riscos apenas aqueles ligados à coleta de sangue, tais como, dor da picada, formação de hematomas.

Por que esta pesquisa está sendo feita?

Esta pesquisa trará benefícios para entender como estão as células de defesa de um indivíduo quando em uma infecção que é gerada pelo micróbico *Mycobacterium tuberculosis*. O teste será realizado em laboratório com os neutrófilos dos indivíduos doadores, separados do sangue. Sendo assim, os participantes desta pesquisa não sofrerão nenhum risco de contaminação. A coleta de sangue deverá ser feita em indivíduos, de ambos os gêneros, com idade entre 18 e 60 anos.

Sua participação será muito importante para a realização do estudo, não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, você poderá desistir de participar a qualquer momento, ou nos procurar para tirar qualquer dúvida, basta avisar os pesquisadores ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones ou contatos que aparecem no final deste documento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Priscilla Mariane Cardoso Silva (emilly@usp.br), Dra. Fabiani Gai Frantz (frantz@fcrp.usp.br) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP/ cep@fcrp.usp.br). Por telefone: (16) 3315-0241 (laboratório USP), (16) 98160-9034 (celular Priscilla), (16) 3315-4213 (Comitê de Ética em Pesquisa).

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 10 mL do meu sangue da veia do braço para a realização de pesquisa. Fui informado sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado também que a finalidade dessa pesquisa é entender como os neutrófilos, célula de defesa do corpo, estão ativados, quando em contato com o micróbio, *Mycobacterium tuberculosis*.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do doador de sangue – Registro

Priscilla M. Cardoso Silva/Prof. Dra. Fabiani G. Frantz

(Pesquisadores Responsáveis)

