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

RICARDO CARDOSO CASTRO

**Papel da sinalização Notch na resposta contra *Mycobacterium tuberculosis* e
a relação com o desenvolvimento da forma ativa da tuberculose humana**

RIBEIRÃO PRETO

2018

RICARDO CARDOSO CASTRO

Papel da sinalização Notch na resposta contra *Mycobacterium tuberculosis* e a relação com o desenvolvimento da forma ativa da tuberculose humana

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiani Gai Frantz

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Castro, Ricardo Cardoso

Papel da sinalização Notch na resposta contra *Mycobacterium tuberculosis* e a relação com o desenvolvimento da forma ativa da tuberculose humana. Ribeirão Preto. p. 108. 2018.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Frantz, Fabiani Gai

1. Biomarcador de progressão. 2. Resposta imune. 3. Sinalização Notch. 4. Tuberculose ativa.

Ricardo Cardoso Castro

Papel da sinalização Notch na resposta contra *Mycobacterium tuberculosis* e a relação com o desenvolvimento da forma ativa da tuberculose humana.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiani Gai Frantz

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Luís Carlos de Castro e Kátia Cilene Cardoso Castro

As duas pessoas mais importantes da minha vida. São os meus maiores idealizadores, sempre acreditaram no meu potencial e nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. Estiveram comigo em todas as etapas e jornadas, ensinaram-me a nunca desistir dos meus objetivos, sempre levantar a cabeça e seguir em frente. Inúmeros foram os momentos em que tiveram que se sacrificar para que eu pudesse chegar até aqui. “Guerreiros”, desde sempre, acompanhei as suas batalhas e sei que tudo que temos hoje é fruto de muito trabalho árduo, dia após dia. Tudo que sou como pessoa, é graças a vocês, exemplo de casal, amor, força, luta, dignidade, caráter, determinação (...) difícil descrever em palavras toda admiração e orgulho que tenho de vocês. Sou muito grato! Obrigado por tudo! Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos e ensinamentos e por sempre se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

A Profa. Dra. Fabiani Gai Frantz, por ter me acolhido tão bem, desde o primeiro momento que estive no laboratório. Pelas oportunidades, por ter acreditado no meu trabalho e por possibilitar toda estrutura necessária para desenvolver esse projeto. Por instruir-me, pelos momentos de aprendizado, pelas discussões científicas e por contribuir diretamente para meu aperfeiçoamento profissional. Pelos momentos de descontração, pelos conselhos e amizade. Sou extremamente grato por tudo! Muito obrigado.

Aos meus pais, Luís de Castro e Kátia Castro, por todo apoio, amor e carinho incondicional por todos esses anos que se seguem de muitas lutas e conquistas. Nunca se esqueçam de que tudo que sou e tenho eu devo a vocês. Se hoje estou concluindo mais essa fase da minha vida, o mérito é nosso! Espero ser sempre motivo de orgulho. Amo muito vocês!

Aos meus familiares, em especial minhas avós, Amélia Castro e Zilda Cardoso, pelo incentivo, carinho e pelas palavras de conforto, mesmo eu estando longe por tanto tempo, sempre torceram pelo meu sucesso. Muito obrigado a todos. Amo todos vocês!

Aos colaboradores, Dr. Matthew Schaller da Universidade de Michigan (USA) e Prof. Dr. Valdes Bollela da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Obrigado por todo apoio e pelas contribuições científicas, vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse projeto.

A Fabiana Zambuzi e Caroline Fontanari, que estiveram comigo desde o início dessa jornada, sou extremamente grato a tudo que vocês fizeram por mim. Por todos os momentos de discussões, por me auxiliarem diariamente na bancada, por compartilhar os seus conhecimentos, pelo apoio e amizade. Vocês foram fundamentais para concretização deste trabalho. Muito obrigado!

Aos amigos do LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética) Felipe Teixeira, Patrick Fernandes, Fabiana Zambuzi, Caroline Fontanari, Priscilla Cardoso, Leonardo Galvão e Cícero Almeida. Obrigado pelas discussões científicas, pelo auxílio na bancada, por me acompanharem em vários momentos durante o desenvolvimento deste projeto e pelos momentos de descontração. Obrigado a todos por todo apoio!

Aos amigos do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses), Marcella Furtado, Morgana Prado, Jefferson Elias, Ana Peti, Poliana Lima, Camila Oliveira, Carlos Sorgi, Karina Zoccal, Edson Junior, Alyne Galvão, Luana Marcedo, Priscilla Tartari, Rayane Maria, Mouzarllem Barros, Gustavo Gardinassi, Marcella Roverato e Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli pelas discussões científicas, pelas palavras de conforto, pelo apoio e por vários momentos de descontração.

Aos amigos que foram indispensáveis durante esta jornada, Relber Gonçalves, Maura dos Santos, Maura Borges, Tamara Rodrigues, Murillo Duarte, Milca Silva, Isabel Guerra, Nathália Quadros, Fany Fonseca, Lucas Lédo, Fayla Diamantino, Mayara Nery, Maiara Bonfim, Rafael Cerqueira, Ana Paula Mioli, Neuza Mioli, Alexandre Garcia, Cristina Cunha, Regis Silva, Diego Fortunato, Kelly Castro, Greyce Prado, Helena de Fátima, Luma Loureiro, Luana Loureiro, Flávia Natividade, Fábio Natividade, Sandra, Sandra Palma, Viviane Tugne (...) obrigado por todo apoio e carinho, cada um de vocês fizeram parte desta história.

A todas as pessoas que se disponibilizaram a participar dessa pesquisa doando voluntariamente amostras de sangue, em especial os pacientes com tuberculose, atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto que acreditaram no nosso trabalho. Dessa forma, contribuíram de maneira significativa para que pudéssemos concluir esse trabalho científico.

Ao suporte técnico da Fabiana Moraes, responsável pelo centro de citometria, por todo auxílio, disponibilidade, dedicação e pelo conhecimento compartilhado.

Ao suporte técnico da Ana Masson, Wendy Rios e Iza Brandão que me auxiliaram em atividades realizadas no laboratório de nível de segurança 3.

Aos funcionários do HC, por todo auxílio durante as abordagens dos pacientes e a coleta de informações para o desenvolvimento do trabalho, em especial a Margarida.

As professoras e alunos que fazem parte do Grupo de Inovação e Pesquisa em Imunologia (GIPI), obrigado pelas discussões científicas e pelos momentos de aprendizado.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, aos professores e alunos por todos os conhecimentos compartilhados e pela oportunidade de aprimoramento profissional. Aos funcionários, em especial a Ana Cristina, pelo auxílio, principalmente nas questões burocráticas.

Aos órgãos de fomento, CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos examinadores do trabalho, pela disponibilidade e por favorecerem o aperfeiçoamento dessa pesquisa.

“Oábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência”.

Augusto Cury

RESUMO

CASTRO, R. C. **Papel da sinalização Notch na resposta contra *Mycobacterium tuberculosis* a relação com o desenvolvimento da forma ativa da tuberculose humana.** 2018. 108 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa bacteriana causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), acomete seres humanos em todo mundo, e é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade dentre as doenças infecciosas. Nesse cenário, a TB ainda é vista como um grande desafio para a ciência e para medicina. Com o estudo de novos alvos moleculares para terapia e diagnóstico, por exemplo, a sinalização Notch tem sido descrita como uma via importante para a manutenção da resposta imunológica durante a infecção por Mtb. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da via Notch na modulação da resposta imune durante a infecção por Mtb em humanos. Neste trabalho foram incluídos 13 pacientes com tuberculose ativa e 13 indivíduos saudáveis. Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas e avaliadas quanto à expressão de receptores Notch 1 – 2 em células T e ligantes Notch, DLL1 – 4 em subpopulações de monócitos por citometria de fluxo e expressão de genes relacionados à via Notch e resposta imune. Além disso, o plasma foi utilizado para avaliar níveis de citocinas, CD14s e CD163s. Ainda, avaliamos a função celular dependente da ativação da via Notch durante a infecção de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis com Mtb H37Rv *in vitro*. Observamos que pacientes com TB ativa apresentaram aumento na expressão de DLL4 em monócitos intermediários e não-clássicos e diminuição na expressão de Notch 2 em células T CD8⁺. *In vitro*, observamos nas culturas de PBMCs, aumento da expressão de DLL4 em monócitos intermediários e Notch 2 em células T CD4⁺. A expressão do ligante DLL4 em monócitos intermediários e a expressão do Notch 1 em células T CD4⁺ em pacientes com TB ativa se correlacionaram positivamente com o grau de lesão pulmonar. Além disso, pacientes com quadros de lesão pulmonar moderado e avançado têm maior expressão de Notch 1 em células T CD4⁺ quando comparados a pacientes com grau mínimo de lesão pulmonar. Pacientes com TB ativa apresentam aumento significativo nos níveis plasmáticos de IL-6, IP-10, CD14s e CD163s e diminuição nos níveis de IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-1 β e RANTES. Os níveis plasmáticos de IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1 β , RANTES e IL-10 se correlacionaram positivamente com o maior grau de lesão pulmonar.

Além disso, demonstramos que os níveis de IFN- γ , IL-17A, IL-1 β , IL-4 e IL-2 se relacionam com maior expressão do receptor Notch 1 em células T CD4⁺, enquanto níveis plasmáticos de IP-10, CD163s e de procalcitonina se correlacionam com maior expressão de Notch 1 em células T CD8⁺. Evidenciamos maior tendência na expressão de HES1 em pacientes com TB ativa e células infectadas *in vitro*, indicando que a via Notch está sendo ativada durante a infecção por Mtb. De forma interessante, *in vitro* as culturas de PBMCs tratadas com inibidor farmacológico da via Notch (GSI), reduziram a produção de IL-17A, IL-2 e IL-10 e aumentaram IL-8, enquanto o tratamento com anti-hDLL4 promoveu o aumento significativo nos níveis de TNF- α e atividade fagocítica de monócitos. Em conclusão, a expressão de receptores e ligantes Notch é alterada durante a TB, em especial o ligante DLL4 em subpopulações de monócitos. Além disso, a via Notch parece ser importante na modulação de respostas pró e anti-inflamatórias. Nesse trabalho, sugerimos que a expressão de Notch 1 em células T e DLL4 em subpopulações de monócitos estão associados com a gravidade da TB. Assim, a detecção desses constituintes da via Notch em PBMCs de pacientes com TB ativa são potenciais biomarcadores para avaliar a progressão da doença.

Palavras-chave: biomarcador de progressão, resposta imune, sinalização *Notch*, tuberculose ativa.

ABSTRACT

CASTRO, R. C. **Role of Notch signaling in the response against *Mycobacterium tuberculosis* in relation to the development of the active form of human Tuberculosis.** 2018. 108 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Tuberculosis (TB) is a bacterial infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), affects humans worldwide, and is considered a major cause of morbidity and mortality among infectious diseases. In this scenario, TB is still seen as a major challenge for science and medicine. With the study of new molecular targets for therapy and diagnosis, for example, Notch signaling has been described as an important pathway for the maintenance of immune response during Mtb infection. Thus, the objective of this work was to evaluate the participation of the Notch pathway in the modulation of the immune response during Mtb infection in humans. In this study, 13 patients with active tuberculosis and 13 healthy individuals were included. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and evaluated for Notch 1 - 2 receptor expression in T cells and Notch, DLL1 - 4 ligands in monocyte subpopulations by flow cytometry and expression of Notch - pathway related genes and immune response. In addition, plasma was used to assess levels of cytokines, CD14s and CD163s. Furthermore, we evaluated the cellular function dependent on the activation of the Notch pathway during the infection of peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects with Mtb H37Rv in vitro. We observed that patients with active TB had increased DLL4 expression in intermediate and nonclassic monocytes and decreased expression of Notch 2 in CD8⁺ T cells. In vitro, we observed in the cultures of PBMCs, increased expression of DLL4 in intermediate monocytes and Notch 2 in CD4⁺ T cells. The expression of the DLL4 linker in intermediate monocytes and the expression of Notch 1 in CD4⁺ T cells in patients with active TB correlated positively with the degree of lung injury. In addition, patients with moderate and advanced lung injury have higher Notch 1 expression in CD4⁺ T cells when compared to patients with a minimal degree of lung injury. Patients with active TB showed a significant increase in plasma levels of IL-6, IP-10, CD14s and CD163s, and decreased levels of IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-1 β and RANTES. The plasma levels of IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1 β , RANTES and IL-10 correlated positively with the highest degree of lung injury. In addition, we demonstrated that levels of IFN- γ , IL-17A, IL-1 β , IL-4 and IL-2 are related to higher Notch 1 receptor expression in CD4⁺ T cells, whereas plasma levels of IP-10,

CD163s and procalcitonin correlate with increased Notch 1 expression in CD8⁺ T cells. We have shown a greater trend in HES1 expression in patients with active TB and in vitro infected cells, indicating that the Notch pathway is being activated during Mtb infection. Interestingly, in vitro cultures of PBMCs treated with the Notch pharmacological inhibitor (GSI), reduced IL-17A, IL-2 and IL-10 production and increased IL-8, while anti-hDLL4 treatment promoted the significant increase in TNF- α levels and monocyte phagocytic activity. In conclusion, the expression of Notch receptors and ligands is altered during TB, especially the DLL4 linker in monocyte subpopulations. In addition, the Notch pathway appears to be important in modulating pro and anti-inflammatory responses. In this work, we suggest that Notch 1 expression in T cells and DLL4 in monocyte subpopulations is associated with TB severity. Thus, detection of these constituents of the Notch pathway in PBMCs of patients with active TB are potential biomarkers to assess disease progression.

Keywords: progression biomarker, immune response, Notch signaling, active tuberculosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM	Metaloproteases
APC	Células apresentadoras de antígeno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCG	<i>Bacillus-Cammette-Guérin</i>
BSA	<i>Bovine serum albumim</i>
BV	<i>Brilliant Violet</i>
CCR	<i>Chemokine receptor</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CD14s	CD14s solúvel
CD163s	CD163 solúvel
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor</i>
DAPT	Inibidor γ -secretase
DC	<i>Dendritic cell</i>
DLL	<i>Delta Like</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DTX	<i>Deltex</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESAT-6	Early Secretory Antigenic Target 6
FCFRB	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
xg	Times gravity

GATA	GATA transcription factor
GSI-I	Gamma-secretase inhibitor
H37Rv	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
HC	Hospital das clínicas
HES	<i>Hairy/enhancer of split</i>
HEY	<i>Hairy-related transcriptional factor</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IL	Interleucina
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
INOS	Óxido sintase induzível
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIN	Unidade de Moléstias Infecciosas
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MØ	Macrófago
μg	Micrograma
mL	Mililitro
μM	Micromolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Ng	Nanograma
NICD	<i>Intracellular Domain of Notch</i>
NO	Óxido nítrico
NOX-2	<i>NADPH oxidase 2</i>
Oligo dT	<i>Deoxy-thymine nucleotides</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	<i>Molecular Pattern of pathogen</i>

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR	Proteína C Reativa
PE	<i>Purified anti-phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein Complex Conjugate</i>
PerCP/Cy5.5	<i>Peridinin-chlorophyll-protein Complex: CY5.5 Conjugate</i>
PMA	<i>Phorbol-12-Myristate 13-Acetate</i>
PPD	Derivado Proteico Purificado
PRR	<i>Receptor Pattern Recognition</i>
qRT-PCR	Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RBP-J/CSL	<i>Recombining Binding Protein Suppressor of Hairless</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Taq DNA Polimerase	DNA polimerase termoestável
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TB-MDR	Tuberculose multirresistente

TCR	Receptores de células T
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TMB	<i>3,3', 5,5;-tetramethylbenzidine</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização dos domínios dos receptores e ligantes de Notch em mamíferos	34
Figura 2. Representação gráfica da ativação da via de sinalização de Notch (representação simplificada).....	35
Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental desenvolvido no estudo	43
Figura 4. Estratégias de <i>gates</i> utilizadas para identificação de células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ em PBMCs	47
Figura 5. Estratégias de <i>gates</i> utilizadas para identificação das subpopulações de monócitos em PBMCs.....	48
Figura 6. Expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em linfócitos de pacientes com tuberculose ativa	57
Figura 7. Expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos de pacientes com tuberculose ativa.	59
Figura 8. Expressão gênica de alvos de Notch e de citocinas em PBMCs de pacientes com tuberculose ativa	61
Figura 9. Assinatura global da expressão gênica de alvos Notch e citocinas de pacientes com tuberculose ativa	62
Figura 10. Quantificação dos níveis de citocinas no plasma de pacientes com TB ativa	64
Figura 11. Quantificação de níveis plasmáticos de CD14s e CD163s em indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa	65
Figura 12. Associação da expressão do receptor Notch 1 em células T CD4 ⁺ com quadros mais graves de lesão pulmonar.....	67
Figura 13. Correlação entre expressão do receptor Notch 1 em células T e mediadores imunológicos em pacientes com tuberculose ativa.....	69
Figura 14. Correlação entre expressão do ligante DLL4 em monócitos clássicos e intermediário e níveis plasmáticos de IL-17A.....	71
Figura 15. Esquema dos resultados encontrados na 1ª parte deste trabalho.....	71
Figura 16. Expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em linfócitos após infecção com Mtb H37Rv.....	73
Figura 17. Expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos após infecção com Mtb H37Rv.....	75
Figura 18. Expressão gênica de HES1 de PBMCs infectados com Mtb H37Rv	76

Figura 19. Quantificação dos níveis de citocina no sobrenadante de cultura de PBMCs infectadas com Mtb H37Rv	78
Figura 20. A função fagocítica de monócitos depende da ativação da via Notch.....	80
Figura 21. Esquema final dos resultados encontrados neste trabalho	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais dos grupos incluídos no estudo	46
Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados para os experimentos de citometria de fluxo.	47
Tabela 3. Classificação dos pacientes com tuberculose ativa.	53
Tabela 4. Correlações da expressão dos receptores Notch 1 e 2 com grau de lesão pulmonar de pacientes com tuberculose	66
Tabela 5. Correlações da expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 com grau de lesão pulmonar de pacientes com tuberculose	67
Tabela 6. Correlações dos níveis de citocinas plasmáticas com grau de lesão pulmonar de pacientes com tuberculose	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 Histórico, etiologia e epidemiologia da tuberculose	26
1.2 Resposta imunológica contra <i>M. tuberculosis</i>	28
1.3 Receptores e ligantes Notch e suas funções	32
1.4 Sinalização Notch na resposta imunológica contra <i>M. tuberculosis</i>	36
2. OBJETIVOS	41
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Casuística	45
4.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	45
4.3 Citometria de fluxo	46
4.4 Obtenção de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	48
4.5 Avaliação da via Notch durante a infecção <i>in vitro</i> com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	49
4.6 Ensaio para detecção de citocinas	50
4.7 Ensaio para detecção de CD163 e CD14 solúveis em amostras de plasma	50
4.8 Avaliação da fagocitose e da atividade microbicida	51
4.9 Extração de RNA total das PBMCs, síntese de cDNA e PCR em tempo real	51
4.10 Avaliação da lesão pulmonar dos pacientes com tuberculose ativa	52
4.11 Análise estatística	53
5. RESULTADOS	56
5.1 Expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em células T de pacientes com tuberculose ativa	56
5.2 Expressão dos ligantes Notch, DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos de pacientes com tuberculose ativa	58
5.3 Avaliação da expressão gênica e dos níveis plasmáticos de citocinas em pacientes com tuberculose ativa	60
5.4 Biomarcadores plasmáticos associados à ativação de monócitos detectados no plasma de pacientes com tuberculose ativa	65
5.5 Associações entre via Notch, mediadores imunológicos e a progressão da tuberculose	66
5.6 Expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em células T após interação com Mtb	72

5.7 Expressão dos ligantes Notch, DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos após interação com Mtb	74
5.8 A sinalização Notch altera a produção de citocinas durante a infecção por Mtb	76
5.9 O bloqueio de DLL4 em monócitos favorece a fagocitose	79
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÕES.....	92
8. REFERÊNCIAS	94
9. ANEXOS	103
9.1 Anexo I	103
9.2 Anexo II.....	104
9.3 Anexo III	105
9.4 Anexo IV	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico, etiologia e epidemiologia da tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa bacteriana causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e que há milhares de anos acomete seres humanos em todo mundo, sendo ainda considerada um grande desafio para a ciência e para medicina [1]. Desde os primeiros relatos históricos associados à TB, percepções epidemiológicas e contribuições científicas foram essenciais para entender a doença [2]. Um dos principais marcos relacionado à descoberta da tuberculose foi em 1882, no qual o bacilo foi isolado e identificado como ácido álcool resiste - o que permitiu sua coloração, pelo cientista Robert Koch [3].

Neste sentido, esforços de diferentes grupos clínicos e de pesquisa de todo o mundo impulsionaram o desenvolvimento de antibioticoterapias que levaram à cura da TB. No entanto, a doença ainda é considerada um grave problema de saúde pública, uma vez que é tida como principal causadora de morbidade e mortalidade proveniente de um único agente infeccioso em todo o mundo [1]. Segundo o último boletim disponibilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016, estima-se que 10,4 milhões de indivíduos manifestaram a TB, sendo que 1,7 milhões foram a óbito [1]. Acredita-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *M. tuberculosis*, apresentando a forma assintomática da doença, conhecida como tuberculose latente [4]. A partir disso, estima-se que 5 a 10% desses indivíduos podem desenvolver a forma ativa durante toda a vida e que essa circunstância está indubitavelmente associada a quadros de deficiência do sistema imunológico. A disfunção das células do sistema imune influencia negativamente no controle do bacilo, permitindo que a micobactéria cresça, acarretando consequentemente, no desenvolvimento da forma ativa da doença [5], [6]. Tal condição clínica é frequentemente vista em indivíduos co-infectados com o HIV [7].

Ademais, o que se torna ainda mais alarmante é que o controle epidemiológico está sendo agravado pelo aumento nos números de casos de indivíduos infectados com cepas resistentes aos fármacos utilizados rotineiramente no tratamento da TB. Avaliações apontam que no ano de 2016 houve 600.000 novos casos de resistência a rifampicina, antibiótico de primeira linha mais efetivo no tratamento da TB. Dentre estes, 490.000 casos também correspondiam a quadros de tuberculose multirresistente (TB-MDR), ou seja, condições clínicas em que há resistência a mais de um dos fármacos utilizados no esquema de escolha no tratamento da doença, como isoniazida, etambutol e pirazinamida [1].

Além dos desafios encontrados em relação ao crescente número de casos de tuberculose resistente às terapias farmacológicas, o diagnóstico é outra questão que merece

atenção. Existem várias ferramentas para o diagnóstico da TB, como testes microbiológicos (baciloscopia e cultura para micobactérias), testes clínicos, (teste de imagem ou raio-X) e teste rápido molecular (TRM). Apesar de serem amplamente utilizados na rotina clínica, várias limitações quanto à utilização destas técnicas podem ser citadas. A baciloscopia, por exemplo, teste que possibilita avaliar a presença de bacilos em amostras de escarro, é um método simples e de baixo custo, porém apresenta baixa sensibilidade. Já o teste de cultura, atualmente considerado o padrão-ouro para diagnóstico da TB, é um teste altamente sensível, que, no entanto, precisa de aproximadamente 4 a 5 semanas para que seja emitido o resultado, retardando o início do tratamento. Além disso, novos testes moleculares apresentam maior sensibilidade e especificidade para detecção de bacilos nas amostras de escarro, possibilitando inclusive a detecção de cepas resistentes à rifampicina. Apesar de possibilitarem um diagnóstico rápido e preciso, a realização desse teste demanda conhecimentos técnicos avançados e gastos financeiros elevados, tornando-a inacessível a muitos centros de saúde. Assim, estudos que busquem novas ferramentas que auxiliem no diagnóstico da tuberculose ainda são fundamentais para o controle efetivo da doença.

Em adição, outro desafio para o controle da tuberculose consiste na busca de novas estratégias de prevenção e tratamento. A vacina atual, BCG é amplamente utilizada e tem mostrado ser eficaz na proteção contra a doença na infância. Porém, vários estudos têm demonstrado que em adolescentes e adultos a eficácia da proteção é variável, demonstrando de 2 a 80 % de variação nas taxas de prevenção. E por fim, o tratamento também compreende uma questão de atenção no combate a tuberculose. O esquema atual, apesar de efetivo, tem duração que varia de 6 meses a um ano de tratamento. Tal período prolongado acarreta grandes taxas de insucesso terapêutico devido ao abandono por parte do paciente aos longos esquemas de tratamento, fator que está diretamente correlacionado com o crescente número de casos de resistência [8].

Diante dessa realidade, novos alvos moleculares têm sido estudados como alvo para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento, buscando torná-los mais efetivos na detecção e controle da infecção. Neste contexto, várias moléculas relacionadas à resposta imune do hospedeiro têm sido demonstradas como potenciais alvos, dentre as quais se encontram as vias de sinalização Notch. Tal via de sinalização constitui um importante alvo de estudo por influenciar a dinâmica da resposta imunológica durante a infecção por *M. tuberculosis*. Porém a compreensão do potencial desta via na infecção ainda não está completamente elucidados sendo necessários novos estudos para entender as

características e mecanismos dessa via de sinalização durante o desenvolvimento e controle da TB [9]–[15].

1.2 Resposta imunológica contra *M. tuberculosis*

A tuberculose é uma infecção crônica, que acomete principalmente o pulmão, no entanto outros órgãos podem ser afetados caso haja a disseminação dos bacilos, promovendo dessa maneira o desenvolvimento da TB extrapulmonar [16]. A forma pulmonar é iniciada através da inalação dos bacilos dispersos no ar por indivíduos infectados, por meio de tosse, espirro ou fala, e que após serem inalados, interagem com células residentes no pulmão, estabelecendo desta maneira a infecção [17], [18]. Uma vez em contato com o bacilo, o hospedeiro poderá desenvolver três diferentes quadros clínicos: os bacilos podem ser eliminados naturalmente pelo hospedeiro, de forma dependente da ativação do sistema imune; permanecer de forma latente no interior de granulomas (90% dos casos), ou ainda induzir, em alguns indivíduos a doença ativa, promovendo a infecção primária [17].

Assim, a resposta imune é fator determinante nos processos infecciosos, direcionado o desfecho dos quadros clínicos apresentados pelo hospedeiro. Apesar de ser extremamente complexa, muito se sabe sobre a resposta imune contra o Mtb. De maneira geral, durante o processo infeccioso, a primeira linha de defesa contra o bacilo é constituída por fagócitos, dentre os quais os macrófagos alveolares, que são células residentes, e os neutrófilos, que são células circulantes rapidamente recrutados para o local da inflamação. O reconhecimento e internalização do bacilo por estas células são mediados por diversos receptores, que são essenciais para ativação celular. Dentre os receptores responsáveis pelo reconhecimento antigênico encontram-se os receptores semelhantes a Toll (TLR 2, 4 e 9), receptores de manose, receptores do complemento, receptores de lectina do tipo C e *scavenger receptors* [19]–[21].

Como mencionado, os macrófagos desempenham importante papel na resposta imune durante a infecção por Mtb. Já é bem estabelecido que os macrófagos alveolares residentes são as principais células capazes de fagocitar o bacilo e promover a ativação da imunidade inata através da produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-12, IL-1 α/β e IL-6, de peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mediadores lipídicos (prostaglandina E2 e lipoxina A4) e quimiocinas (MCP-1, MIP-1 α , MIP β e RANTES). Juntos, estes mediadores são responsáveis por manter o microambiente inflamatório e, conseqüentemente, promover o recrutamento de novas células para o local de infecção, a fim de restringir e/ou destruir os bacilos [22].

Nesse cenário, o recrutamento de neutrófilos do sangue para o local da infecção parece ser importante na resposta imune contra Mtb, já que a partir do reconhecimento e interação com os bacilos, essas células passam a produzir e secretar citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL1 α e TNF- α), quimiocinas (CXCL1, CXCL8, MIP-1 α e MIP- β), peptídeos antimicrobianos (α -defensinas e *neutrophil extracellular traps* (NETs)) e intermédios reativos de oxigênio capazes de combater a micobactéria [17], [23], [24]. No entanto, a participação dos neutrófilos no estabelecimento de uma resposta protetora ainda é controversa, uma vez que, tem sido associada à imunopatogenese da TB [25], [26].

Ainda no contexto da ativação da imunidade inata, outras células desempenham importantes funções no reconhecimento e resposta inicial contra o Mtb. Células NK (células natural *killer*) e células T $\gamma\delta$, assim como os neutrófilos, são recrutadas rapidamente após a infecção e auxiliam outras células na eliminação dos bacilos através da detecção e eliminação de células infectadas, da liberação de grânulos citotóxicos, que promovem a lise celular, e também pela produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α , importantes em respostas protetoras contra o bacilo [27], [28], [29].

Apesar dos esforços iniciais do sistema imunológico, o Mtb possui fatores de virulência, que facilitam o escape dos mecanismos microbicidas dos fagócitos, sendo capaz de inibir a fusão do fagossoma com o lisossoma, evitando a sua morte e facilitando a sua replicação no interior dessas células [30], [31]. Desta forma, outros mecanismos de defesa do hospedeiro precisam ser também ativados para garantir o máximo controle da infecção. Neste contexto, a associação de fatores imunológicos inatos e adaptativos é essencial ao desenvolvimento da resposta imune efetora contra Mtb [32].

A ativação de uma resposta adaptativa eficaz é dependente da apresentação de antígenos às células T *naive*. Dentre as células com esta função, as células dendríticas (DC) desempenham importante papel, uma vez que constituem a principal célula apresentadora de antígenos (APC), sendo capazes de realizar uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. As DCs imaturas, originadas a partir do recrutamento de células mononucleares para o local da infecção, principalmente os monócitos, reconhecem os antígenos bacterianos, internalizam o bacilo e realizam o processamento dos antígenos micobacterianos. Assim, uma vez maduras após este processo, com expressão de antígenos e moléculas co-estimuladoras na superfície, tais células migram para os linfonodos, sob influência da IL-12 e quimiocinas (CCL19 e CCL22) migram para os linfonodos drenantes, onde iniciam a ativação de células T [33], [34]. Do mesmo modo, existem DCs residentes (derivadas do saco vitelínico) que também participam da defesa inicial contra o bacilo e auxiliam na apresentação de antígenos às células

T. Tal processo de ativação e migração das células dendríticas, e consequente ativação de células T podem levar de 8 a 12 dias depois da infecção. O atraso na migração destas células apresentadoras aos linfonodos constitui uma das dificuldades encontradas durante a resposta contra *Mtb*, o que retarda a resposta adaptativa e permite a replicação desenfreada do bacilo [35].

A ativação de células T CD4⁺ auxiliares e células T CD8⁺ citotóxicas pelas APCs são mediadas por diferentes sinais. Desta forma, a ativação depende inicialmente da interação de receptores de superfície destas células, o MHC (Complexo principal de histocompatibilidade I e II) presente nas APCs e o TCR (receptores de células T) expressos pelas células T. Concomitantemente, é necessária a interação entre receptores co-estimuladores B7 (1/2) e CD28, expressos respectivamente na APCs e nas células T. Esta ligação é essencial para disponibilizar um segundo sinal que auxilia na ativação e, por fim, o terceiro sinal, que é proporcionado através de citocinas, liberadas por células APCs, como IL-12, TNF, IL-6, entre outras [36], [37].

A apresentação de antígeno por células APCs via MHC II promove ativação de células T CD4⁺, que posteriormente se diferenciam em subtipos celulares efetores distintos que divergem principalmente na produção e secreção de citocinas. Os principais perfis celulares desencadeados por esta ativação são T *Helper* 1 (Th1), T *Helper* 2 (Th2) e T *Helper* 17 (Th17) [37]. É importante mencionar que a polarização para um tipo específico de célula T *helper* é dependente do microambiente inflamatório e dos antígenos do patógeno ao quais as células estão sendo expostas. Nesse sentido, a presença de citocinas específicas favorece perfis distintos, como a IL-12 que desencadeia a ativação de células para o perfil Th1, IL-4 para o perfil Th2, e IL-6 e TGF- β na ativação de células Th17. Ademais, mecanismos intracelulares, como fatores de transcrição são fundamentais para direcionar a diferenciação dos perfis celulares. Fatores de transcrição STAT4, STAT1 e T-bet promovem a polarização para o perfil Th1, enquanto STAT3 e ROR γ t estão associados à polarização para Th17 e, por sua vez, STAT6 e GATA-3 para o perfil Th2 [37].

Classicamente, a resposta celular eficaz contra *Mtb* está associada ao padrão Th1 [33]. As células Th1 antígeno-específicas migram para os pulmões, sítio de infecção, onde iniciam a produção de IFN- γ , promovendo a maior ativação da resposta de macrófagos, que passam a produzir e liberar mais citocinas e fatores microbicidas, como óxido nítrico (NO) e espécies reativas do oxigênio (ROS) [33], [38]. Estudos realizados em humanos e modelos experimentais em camundongos demonstraram que as células T CD4⁺ e as citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α são fundamentais no controle da infecção por *Mtb* [34].

Do mesmo modo, estudos têm indicado que células Th17 também desempenham um papel importante na imunidade protetora contra Mtb, uma vez que essa população de células T *helper* produtoras de citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 [39], [40], auxiliam principalmente no recrutamento de neutrófilos para o pulmão, favorecendo, dessa maneira, a formação do granuloma e culminando na eliminação dos bacilos no local da infecção. Além do mais, os receptores da IL-17 (IL-17RA) são amplamente expressos em diferentes órgãos, como pulmão e baço, e muitas células importantes para o controle do Mtb são responsivas a IL-17, como por exemplo, macrófagos, DCs e linfócitos, influenciando dessa maneira nas respostas pró-inflamatórias. Neste cenário, células $\gamma\delta$ também desempenham um papel interessante, já que são fontes iniciais de IL-17 durante a infecção por Mtb e, conseqüentemente, auxiliam células Th17 na produção desta citocina importante no controle do bacilo [41], [42].

Neste contexto de polarização celular, alguns grupos de pesquisas têm demonstrado que o desenvolvimento da tuberculose, bem como gravidade da doença estão intimamente associados ao desequilíbrio na resposta imunológica. Pacientes com quadros mais graves de infecção apresentam predominantemente uma resposta do perfil Th2, com concomitante redução da resposta do perfil Th1 [43]–[45]. Além disso, o papel protetor da ativação de células do perfil Th17 em infecções crônicas, como a TB, ainda é questionado, pois se acredita que em determinados casos essa resposta pode ser prejudicial e auxiliar na propagação do bacilo. Sendo assim, é notório que durante a TB, a imunorregulação das respostas de células T, principalmente Th1 e Th17, são cruciais para proporcionar uma imunidade contra o bacilo e prevenir efeitos imunopatológicos [40].

Além das células T auxiliares, a ativação de células T CD8⁺ citotóxicas também é fundamental na tuberculose. Tais células reconhecem estritamente antígenos via MHC I expressos praticamente em todas as células nucleadas, incluindo APCs. Os mecanismos decorrentes da ativação das células T CD8⁺ são importantes na eliminação de células infectadas, através da ação de grânulos líticos (perforinas e grazimas) e pela interação de receptores de morte, como FAS e FAS ligante. A produção e liberação de perforinas por células T CD8⁺ induzem poros na membrana celular de células infectadas e permitem a entrada de proteínas líticas, como grazimas que promovem a lise celular. Por sua vez, a expressão da molécula FAS ligante nas células T CD8⁺ interage com receptores FAS nas células alvo e induz apoptose [46], [47]. A partir da lise de células infectadas, os bacilos se tornam visíveis e permissivos a serem reconhecidos, fagocitados e eliminados por células fagocíticas. Além de produzir mecanismos de morte celular descritos acima, as células T

CD8⁺ também são capazes de produzir citocinas importantes para resposta inflamatória contra o bacilo, principalmente IL-2, IFN- γ e TNF- α [47], [48].

Assim, a forma com que o sistema imunológico é ativado no hospedeiro é crucial para o desfecho da infecção. É importante mencionar ainda que o curso da infecção pode ser definido por fatores intrínsecos ao hospedeiro, inerentes à bactéria ou ao ambiente, sendo que a interação do ambiente, do hospedeiro e do patógeno são essenciais para o desenvolvimento e progressão da doença [49]. Vários fatores ambientais podem prejudicar a resposta imune e atuar como fatores de riscos. Neste contexto, as condições socioeconômicas precárias, que limitam o acesso ao sistema de saúde ou a própria precariedade no sistema de saúde, saneamento básico insuficiente, imunodeficiências, co-infecção com o HIV, diabetes mellitus, câncer, a própria quimioterapia, entre outros são importantes condições que influenciam a função das células do sistema imune e, conseqüentemente, favorecem a infecção. [1], [49].

Com base nos pontos já descritos, compreender os diferentes mecanismos que modulam a ativação adequada da resposta imune, envolvendo as vias de sinalização importantes para a ativação das células T são pontos que ainda precisam ser melhor elucidados no contexto da infecção por Mtb. Dentre as vias de ativação do sistema imune, encontram-se os receptores e ligantes da via Notch, que apresentam potencial de modulação da ativação das células T, constituindo assim importante via para investigação. Determinar a participação desta via na tuberculose constitui um dos objetivos do presente trabalho.

1.3 Receptores e ligantes Notch e suas funções

A via de sinalização Notch foi descrita primeiramente por Morgan e colaboradores, através de pesquisas genéticas realizadas em *Drosophila melanogaster*, onde foi identificado um locus, que quando sofria mutações, surgiam *notches* (rachaduras) nas asas do inseto [50], daí a denominação de “locus Notch”. Atualmente, já é descrito que a via canônica de Notch permaneceu conservada ao longo da evolução e que, desde a sua descoberta, tem sido alvo de muitas pesquisas, que revelaram a sua importância para diversos mecanismos celulares de organismos metazoários, dentre os quais estão a determinação do destino celular, hematopoese, auto-renovação de tecidos, proliferação e apoptose durante a embriogênese e dentre outros [51], [52], [53].

Em mamíferos são descritos quatro tipos de receptores Notch, sendo Notch 1, Notch 2, Notch 3 e Notch 4 e cinco ligantes: três ligantes Notch *Delta-like* (DLL1, DLL3 e DLL4) e dois ligantes da família Jagged (Jag1 e Jag2) (figura 1) [54], [55], [56]. De maneira geral, os receptores Notch e seus ligantes são proteínas transmembrana de passagem única que, na

maioria das ocasiões, necessitam da interação célula-célula e do processamento proteolítico para promover a sinalização [54].

As estruturas dos receptores e seus ligantes já são bem descritas na literatura. Os receptores Notch são constituídos por domínio extracelular dos (DECN) com uma extremidade N-terminal, que contém 29-36 repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) [57]. Algumas repetições de EGF desempenham papéis importantes na determinação da estrutura e na afinidade dos receptores Notch aos seus ligantes, principalmente ao se ligarem aos íons Ca^{2+} [58], [59]. As repetições de EGF são seguidas por um domínio denominado região reguladora negativa (LNR), composto por 3 repetições Notch-Lin12 (LIN) ricas em cisteína e um domínio de heterodimerização. O LNR tem por função impedir que os receptores sejam ativados na ausência dos ligantes [60]. O domínio único transmembrana, é seguido por módulo de associação RBPjk (RAM), seguida por uma sequência de localização nuclear (NSL) e sete repetições de anquirina (ANK) [60]. Além disso, após o domínio ANK há dois NSL adicionais e por fim, na região C-terminal contém um domínio de transativação vagamente definido e evolutivamente divergente (TAD), composto por motivos ricos em prolina, ácido glutâmico, serina, treonina (PEST) que possuem sinais de degradação (*degrons*) que regulam a estabilidade do domínio intracelular dos receptores Notch (DICN) [55].

Tais receptores são sintetizados no retículo endoplasmático, como uma pró-proteína. Do retículo, são encaminhados para o complexo de Golgi, no qual são clivados no primeiro sítio de clivagem (S1) por uma protease designada *furin-like* convertase. A partir disso, os receptores passam por um processo de maturação e montagem do heterodímero, sendo posteriormente direcionados para a membrana plasmática, onde poderão interagir com seus respectivos ligantes para ativação da via [60].

Em relação aos ligantes de Notch, a classe mais conhecida é caracterizada por três motivos estruturais: os domínios extracelulares são caracterizados pela presença de um domínio Delta /Serrate /LAG-2 (DSL), múltiplas repetições semelhantes à EGF chamadas de domínio DOS (Delta e OSM-11-like proteins) e repetições semelhantes à EGF. Além disso, os ligantes podem ser classificados levando em consideração a presença e ausência dos domínios DOS e domínios ricos em cisteína. Por exemplo, ligantes Jag1 e Jag2 possuem uma região rica em cisteína (RRC) e apresentam aproximadamente duas vezes mais repetições semelhantes à EGF em comparação aos ligantes do tipo *Delta-like* [61]. Na figura 1 podemos observar a organização molecular dos receptores e seus ligantes.

RECEPTORES NOTCH

LIGANTES NOTCH

Figura 1. Organização dos domínios dos receptores e ligantes de Notch em mamíferos. À esquerda estão representados os receptores Notch e à direita os seus ligantes. Em mamíferos existem 4 tipos de receptores Notch (Notch 1-4), três ligantes NotchDelta-like (DLL1, DLL3 e DLL4) e dois ligantes da família Jagged (Jagged1 e Jagged2). Os receptores Notch são constituídos por um domínio extracelular (DECN) composto por repetições de fator de crescimento epidérmico (EGF) que diferem no número de repetições (29-36). As repetições de EGF são seguidas pela Região Reguladora Negativa (LNR). O domínio único transmembranar (DTM), é seguido pelo domínio intracelular (DICN) contido inicialmente por um módulo de associação RBPjk (RAM), seguida por uma sequência de localização nuclear (NSL) e sete repetições de anquirina (ANK). Após o domínio ANK há 2 NSL adicionais e um domínio de transativação vagamente definido e evolutivamente divergentes constituído por motivos ricos em prolina, ácido glutâmico, serina, treonina (PEST). Em relação aos ligantes de Notch, os domínios extracelulares são caracterizados pela presença de um domínio Delta / Serrate / LAG-2 (DSL), múltiplas repetições semelhantes à EGF chamadas de domínio DOS (Delta e QSM-11-like proteins) e repetições semelhantes à EGF. Os ligantes podem ser classificados através da presença e ausência dos domínios DOS e domínios ricos em cisteína. Adaptado de Kopan, R. et al (2009).

Uma vez expressos na superfície celular, a sinalização canônica Notch é iniciada a partir da interação ligante/receptor e a sua ativação é intercedida por sequências de eventos proteolíticos [56], [62]. O evento proteolítico inicial é mediado através da protease ADAM (desintegrina e metaloprotease), que promove a clivagem do receptor Notch em uma região que antecede o domínio transmembrana, conhecida também como sítio 2 (S2) de clivagem. A partir da clivagem e liberação do domínio extracelular do receptor, o domínio transmembrana e intracelular que permaneceram associados à membrana celular, sofrem ação proteolítica nos sítios 3 (S3) e 4 (S4) de clivagem através da γ -secretase, um membro multicomponente de uma família crescente de proteases de clivagem intracelular (I-CLIPs). Consequentemente, após a clivagem o DICN é liberado e translocado para o núcleo. É importante mencionar que o DICN não tem a capacidade de se ligar diretamente ao DNA, sendo necessário que o mesmo se associe a uma proteína de ligação a DNA, denominada CSL ou RBPjK, através dos seus domínios RAM e ANK. Com o auxílio do domínio ANK, são recrutados co-ativadores de transcrição (CoA), tais como *Mastermind* e MED8, que são importantes para formação do complexo transcricionalmente ativo. [55]

Dessa forma, após a formação do complexo DICN/CSL/CoA será possível à transcrição e regulação positiva de genes alvo de Notch, tais como genes da família *HES* (*Hairy/enhancer of Split*) e *HEY* (*Hairy/Enhancer of Split related with YRPW motif*). Os genes relacionados à *HES/HEY* atuam principalmente como reguladores transcricionais e estão envolvidos na regulação de diversos mecanismos moleculares no desenvolvimento de organismos metazoários [63], [64].

É válido mencionar que a sinalização Notch possui elementos essenciais que tem por função regular minuciosamente a ativação da via, como por exemplo, elementos repressores, tal como SMRT que na ausência do NICD induz um estado repressivo e ubiquitinas ligases que estão associadas à degradação e reciclagem de receptores e ligantes, como exemplo a DTX. [55].

Figura 2. Representação gráfica da ativação da via de sinalização de Notch (representação simplificada). O receptor maduro é produzido após clivagem proteolítica pela *furin-like* convertase no sítio 1 de clivagem (S1). A partir disso, o receptor é direcionado para a superfície celular como um heterodímero. O receptor Notch é ativado através da interação com seu ligante expresso na célula adjacente que gera uma mudança conformacional no receptor. A alteração conformacional promove a exposição do sítio 2 de clivagem (S2), que posteriormente sofrerá ação proteolítica da metaloproteíase ADAM. Após essa clivagem a PECN é liberada e endocitada juntamente com o ligante pela célula adjacente. O domínio transmembrana intracelular que permaneceram associados à membrana celular, sofrem ação proteolítica nos sítios 3 (S3) e 4 (S4) de clivagem através da γ -secretase, culminando na liberação do NICD. O NICD é direcionado para o núcleo onde se associa a proteínas de ligação ao DNA (CSL / RBPjk) que promovem o recrutamento de co-ativadores de transcrição (CoA), tais como Mastermind e MED8. Dessa forma, após a formação do complexo DICN/CSL/CoA transcripcionalmente ativo será possível à transcrição e regulação positiva de genes alvo de Notch, tais como genes da família *HES* e *HEY*. Adaptado de Kopan, R. et al (2009).

Como já mencionado, a via Notch é importante para muitos processos celulares, desde o desenvolvimento até funções efectoras. Ademais, nos últimos anos, diversas pesquisas mostraram que a via Notch estão envolvidas no desenvolvimento e regulação de respostas pró-inflamatórias, [65], [66], [67], [68] na polarização de células T [69], [70], [71], [72] e na formação de memória imunológica. Tal associação entre a via Notch e o sistema imune foram possíveis visto que há ampla expressão de receptores e ligantes Notch em células do sistema imune, como por exemplo, células T, que expressam receptores Notch1, 2, 3 e 4 [70], [73], [74] e APCs, com ampla expressão de ligantes DLL1, DLL4, Jagged1 [14], [76], [75].

Apesar da relação entre a expressão dos constituintes da via com a modulação da resposta imunológica, trabalhos têm descrito a associação da sinalização anormal de Notch com diversos processos patológicos, como no câncer [55]. Dessa maneira, se torna notório que constituintes dessa via de sinalização têm sido vistos como um potencial alvo terapêutico e como biomarcadores de diversas doenças, podendo ser estudados em processos infecciosos, como na tuberculose [77],[78], [79],[80].

1.4 Sinalização Notch na resposta imunológica contra *M. Tuberculosis*

Apesar das poucas informações disponíveis sobre a real função da sinalização da via Notch durante a infecção por Mtb, alguns estudos têm demonstrado resultados interessantes, principalmente no que diz respeito aos efeitos desta via na modulação da resposta imunológica contra antígenos micobacterianos.

Nessa perspectiva, Narayana e colaboradores (2008) realizaram estudo em macrófagos peritoneais de camundongos infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG e evidenciaram uma regulação positiva na expressão de receptores Notch1, além de um subsequente aumento na expressão de Supressor de Sinalização de Citocinas 3 (SOCS3). O aumento de SOCS3 demonstrou ser resultado da ação da via Notch através das vias de Fosfatidilinositol 3-Quinase (PI3K) e da Proteína-Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK). A função primordial do SOCS3 é mediar a regulação negativa de diversas citocinas, através da inibição da sinalização de JAK-STAT. Em adição, no mesmo estudo, demonstrou-se que a administração de inibidores farmacológicos da via Notch, tal como o GSI-I, um inibidor da γ -secretase, resultou em uma perda significativa no processamento do receptor Notch1, com subsequente bloqueio na indução de SOCS3 em macrófagos, demonstrando que ambos os processos estão associados. Além disso, foi apresentado pelos autores que a inibição da sinalização do receptor do tipo Toll 2 (TLR2), leva a diminuição da expressão de *HES1* e redução acentuada dos níveis de SOCS3. Tais resultados corroboram a hipótese de que eventos iniciais da

sinalização de TLR2 dependente de MyD88 são importantes para auxiliar na ativação e expressão do receptor Notch1 e na indução de SOCS3, durante a infecção com BCG[9],[81],[82].

Adicionalmente, estudos realizados por Bansal e colaboradores em 2009, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos infectados *in vitro* com *M. bovis* BCG, observaram que a ativação da sinalização de TLR2, conduz a expressão de COX-2. Segundo os autores, a expressão da COX-2 pode ser mediada inicialmente através da ação de *Nitric oxide synthase* (iNOS), enzima importante para a produção de óxido nítrico (NO), que auxiliam na ativação da cascata de sinalização de Notch 1-PI3K, acarretando na ativação do NF-κB e, por fim, proporcionando a expressão da COX-2 [83]. Em conformidade, Kapoor e colaboradores em 2010, demonstraram que a estimulação de TLR2 por *M. bovis* BCG *in vitro* utilizando os mesmos modelos experimentais de macrófagos utilizados por Bansal et al, 2009, acarretou na regulação positiva de receptores Notch1. Além disso, a produção de NO promoveu a superexpressão de Jag1 em macrófagos, ao mesmo tempo em que foi observada uma maior indução da ativação da via de sinalização de Notch1. Neste contexto, concluiu-se que a indução do receptor Notch e a expressão de ligantes em células mielóides pode ser mediada por TLRs, resultando na ativação não-canônica da cascata de sinalização via Notch [12].

Ainda associando a ativação da via Notch com mecanismo da resposta imune em infecções micobacterianas, em 2013, Palaga e colaboradores investigaram o envolvimento da via Notch na regulação da apoptose em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos, infectados *in vitro* com *M. bovis* BCG e tratados com PPD. Os autores observaram maior expressão de receptores Notch1 em macrófagos, ao mesmo tempo em que foram obtidos níveis maiores de Mcl-1 (*myeloid cell leukaemia-1*). O Mcl-1 é um membro anti-apoptótico da família do linfoma de células B 2 (BCL-2), e em macrófagos exerce um papel essencial na sobrevivência dessas células [11].

Em 2008, Ito e colaboradores em ensaios *in vivo* utilizando camundongos deficientes do gene que expressa o TLR9 (*TLR9*^{-/-}) imunizados com BCG e subsequentemente desafiados com esferas revestidas com PPD, notaram alterações na resposta imunológica e diminuição do perfil de citocinas Th17. Além disso, evidenciaram a diminuição e o acúmulo inadequado de células dendríticas na formação de granuloma, bem como redução na expressão de DLL4 nestas células. Em adição, a neutralização específica de DLL4 durante experimentos *in vitro*, utilizando anticorpos anti-DLL4, promoveu a diminuição da expressão de IL-17 por células T, enquanto que a superexpressão de DLL4 induziu o aumento proporcional na produção desta citocina. Sendo assim, o estudo sugere que a expressão do receptor TLR9 promove maior

expressão de DLL4 em DC mielóides e que a expressão deste ligante da via Notch influencia na polarização de células T para o padrão Th17, reforçando a função da via na modulação da resposta imunológica. [10].

Corroborando estes dados, Schaller e colaboradores (2016) demonstraram, em modelo de infecção por *M. bovis BCG*, aumento na expressão de ligantes da via, especialmente DLL4 em células dendríticas e células progenitoras da medula óssea. Ainda, foi possível observar que o bloqueio da via com anticorpos específicos (anti-DLL4) reduziu de maneira significativa a produção de citocinas IFN- γ e IL-17 pelas células T. Ademais, ao avaliar a expressão dos constituintes da via em PBMCs de pacientes com tuberculose ativa, os autores evidenciaram uma maior expressão do ligante DLL4 em monócitos nos indivíduos com a doença ativa em comparação aos indivíduos saudáveis e pacientes após seis meses de tratamento. Em conjunto, os resultados deste estudo apresentam evidências de que o ligante DLL4 é amplamente expresso em monócitos durante a infecção micobacteriana, podendo desempenhar importante modulação nas repostas de células T CD4⁺, influenciando de maneira significativa a ativação e polarização destas células, visto a produção de citocinas. [14].

Por fim, evidenciando ainda mais a associação da ativação da via com a modulação da resposta imune, estudo recente realizado por Li e colaboradores (2018) avaliou influência da sinalização Notch sobre o padrão de resposta de células T em amostras de PBMCs de indivíduos saudáveis, pacientes com tuberculose latente e ativa estimuladas *in vitro* com antígenos micobacterianos. Para isso, PBMCs foram tratadas por 72 horas com diferentes concentrações de DAPT (inibidor da γ -secretase), inibidor farmacológico da via Notch e, posteriormente, estimuladas com ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6), antígeno derivado de *Mtb*. Antes do tratamento os autores observaram que PBMCs de pacientes com tuberculose ativa possuíam aumento do número de células com padrão Th2 de resposta e expressão aumentada de GATA3 e IL-4. O tratamento com DAPT apresentou efeitos inibitórios sob a via Notch e promoveu diminuição de células Th2 em pacientes com tuberculose ativa, de forma dose-dependente. Além disso, foi vista uma diminuição significativa dos níveis de expressão de GATA3 e IL-4. A partir desses resultados os autores sugerem que o bloqueio da sinalização Notch, pode reduzir resposta de perfil Th2 e favorecer o equilíbrio de resposta Th1 durante a infecção por *Mtb* [15].

Com base no exposto, os estudos realizados até o momento demonstraram que, a ativação da via de sinalização Notch parece ser importante na modulação da resposta imunológica durante a infecção por *Mtb*, principalmente ao regular as respostas mediadas por

células T, essenciais para o controle efetivo da doença. Tal modulação reflete diretamente nas funções efectoras dos linfócitos, direcionando a produção de citocinas e regulando a sobrevivência destas células. Assim, a expressão dos receptores e ligantes pode resultar em diferentes desfechos para o hospedeiro, e conseqüentemente, na progressão e gravidade da tuberculose [20], [21]. É evidente que muitos esforços têm sido empregados para entender melhor a participação da via de sinalização Notch na indução de respostas imunes efetivas, bem como compreender o potencial de regulação da via durante a tuberculose, que constituem pontos de interesse deste trabalho.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a participação da via Notch na modulação da resposta imune durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em humanos.

Objetivos específicos:

1. Determinar a expressão dos receptores e ligantes de Notch em células do sistema imune de pacientes com tuberculose ativa e correlacionar com mediadores imunológicos e os diferentes estágios da doença;
2. Estabelecer como a modulação da via Notch influencia a resposta de células mononucleares do sangue periférico contra o *Mycobacterium tuberculosis* em modelo de infecção *in vitro*.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

1º ETAPA

Avaliação da expressão de Receptores e Ligantes Notch em PBMCs

2º ETAPA

Avaliação da função celular dependente da ativação da via Notch

Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental desenvolvido no estudo. O trabalho foi esquematizado em duas etapas, no qual foram utilizados grupos de indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa. Na primeira etapa, após coleta do sangue periférico, as células mononucleares foram separadas e analisadas quanto à expressão de receptores e ligantes Notch por citometria de fluxo e expressão gênica de genes relacionados à via Notch e a resposta imune. Utilizou-se plasma para avaliar níveis de citocinas, CD14s e CD163s. Ademais, foram realizadas análises de correlações entre expressão dos receptores, ligantes Notch e mediadores imunes com dados clínicos dos pacientes com tuberculose ativa. Na segunda etapa, foi avaliada a função celular dependente da ativação da via Notch durante a infecção por Mtb. Para isso, PBMCs de indivíduos controle foram infectadas com cepas de Mtb (H37Rv) *in vitro*, e em seguida foi avaliada a expressão de receptores e ligantes Notch através de citometria de fluxo. Em culturas de PBMCs tratadas ou não com o GSI, com os anticorpos anti-hDLL1 e hDLL4 e com as proteínas recombinantes DLL1 e DLL4 foi analisada a expressão gênica de HES1 (PBMCs) e a produção de citocinas (sobrenadante). Em adição, foram avaliadas a capacidade fagocítica e microbicida de monócitos na presença de anti-hDLL1 e hDLL4.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

Para realização do presente trabalho, foram recrutados 13 pacientes diagnosticados com tuberculose ativa, com tempo de tratamento inferior a 2 meses, atendidos na Unidade de Moléstias Infecciosas (MIN) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido no momento da consulta clínica de rotina, após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa. A doença ativa foi diagnosticada através de sinais clínicos, como tosse, febre, expectoração, sudorese noturna, perda de peso, com duração de 4 semanas ou mais, aliados aos exames laboratoriais microbiológicos, moleculares e radiológicos para confirmação da suspeita clínica. Já para a composição do grupo controle, 13 indivíduos previamente saudáveis, pertencentes à comunidade USP, como docentes, funcionários e alunos, sem história prévia de TB ativa, foram convidados a participar da pesquisa. É válido mencionar que para composição dos grupos, controle e tuberculose ativa, foram recrutados indivíduos de ambos os gêneros, com idade entre 18 a 65 anos. Em contrapartida, foram excluídos da pesquisa mulheres grávidas, crianças, idosos acima de 65 anos e pacientes apresentando co-infecções ou co-morbidades como HIV, hepatites e outras doenças crônicas. Ainda, no grupo controle, foram excluídos aqueles que faziam uso de medicamentos que promovem alterações no sistema imunológico, tais como, anti-inflamatórios. Ademais, as células isoladas dos indivíduos controle também foram utilizadas para realização dos experimentos de infecção *in vitro* com *Mtb*. Todos os indivíduos que consentiram em participar da pesquisa registraram sua autorização através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II e III), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEP/FCFRP-USP: nº 427-CAAE, nº 62362216.8.0000.5403) (Anexo I).

4.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Após assentimento e assinatura do TCLE, todos os participantes doaram 40 mL de sangue total através de punção venosa em tubos de coleta BD Vacutainer® com heparina (Vacutainer®; Becton, Dickinson and Company). Após a coleta, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 400 x g, à temperatura ambiente para coleta do plasma. Em seguida, a porção celular foi diluída em PBS (Phosphate Buffered Saline) 1x. O sangue diluído foi transferido delicadamente para um novo tubo Falcon contendo Ficoll-Paque™ PLUS, d=1,078 g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Imediatamente, as amostras foram centrifugadas a 600g por 30 minutos, a à temperatura ambiente para que

seja possível a separação da camada de células mononucleares. As células presentes sobre o gradiente de separação foram coletadas e transferidas para um novo tubo e lavadas por duas vezes com PBS 1x para obtenção do precipitado celular. Adicionalmente, após separação, foi realizada a lise das hemácias remanescentes utilizando solução de NH₄Cl. Por fim, o precipitado celular obtido após o processo de isolamento, foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 (GibcoBRL), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) para a realização de ajuste do número de células para os procedimentos subsequentes.

Tabela 1. Características gerais dos grupos incluídos no estudo

Grupos	Controle	Pacientes TB. A
N	13	13
Gênero (H/M)	10/3	8/5
Idade (média)	30±8,9	44±10
HIV+	0	0
Esfregaço de expectoração +	NA	9
Cultura +	NA	8
PCR +	NA	12
IGRA +	0	ND
Tempo de tratamento (média)	NA	22±22

Número de indivíduos por grupo (N); gênero: Homem (H)/ Mulher (M); Idade (média (anos)/desvio padrão); teste molecular - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), *Interferon Gamma Release Assay* (IGRA); tempo de tratamento (média/dias).

4.3. Citometria de fluxo

A partir de 1×10^6 células/PBMC de indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa, foram realizadas imuno-marcações de moléculas de superfície para caracterização celular quanto à expressão de: CD14, CD16, DLL4 e DLL1 para populações de monócitos e CD3, CD4, CD8, CXCR3, CCR6, Notch 1 e 2 para populações de células T. Para tanto, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS contendo 2% de SBF e a esse volume foi adicionado 5 µL de cada anticorpo fluorescente contra cada uma das moléculas alvo. A marcação foi realizada por 25 minutos a 4°C, no escuro. Após o tempo de incubação, foi adicionado 2 mL de PBS contendo 2% de SBF em cada tubo. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 400 xg, 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, as células foram fixadas em 200 µL de PBS com 1% de formaldeído e mantidas a 4°C até o momento da aquisição. Para avaliação dos dados obtidos, foram adquiridos de 100.000 a 200.000 eventos de cada amostra no citômetro LRS II Fortessa (BD Biosciences, San Diego, EUA) e as análises foram realizadas no BD FACSDiva 8.0.1. e no *software* FlowJo versão 7.6.5. As estratégias de *gates* utilizadas nesses experimentos estão evidenciadas nas figuras 4 e 5.

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados para os experimentos de citometria de fluxo

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Catálogo
CD14	PE/Cy7	M5E2	Biolegend	301814
CD16	BV 510	3G8	Biolegend	302048
CD3	PE	OKT3	Biolegend	317308
CD4	FITC	A161A1	Biolegend	357406
CD8	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	Biolegend	301032
CXCR3	BV 510	G025H7	Biolegend	353726
CCR6	PE-Cy7	11A9	BD Biosciences	560620
Notch 1	PE	MHN1-519	Biolegend	352106
Notch 2	APC	MHN2-25	Biolegend	348306
DLL1	PE	MHD1-314	Biolegend	346404
DLL4	APC	MHD4-46	Biolegend	346508

Figura 4. Estratégias de *gates* utilizadas para identificação de células T CD4⁺ e células T CD8⁺ em PBMCs. Avaliação da expressão dos receptores Notch 1, Notch 2, CXCR3 e CCR6. No primeiro quadro à esquerda está apresentada a aquisição no citômetro e análise por tamanho (FSC-A), complexidade (SSC-A) e a *gate* é correspondente à população de linfócitos. A partir da *gate* de linfócitos, avaliamos as populações de células T CD4⁺ (verde) e células T CD8⁺ (Azul) representados na forma na *dot plot* no quadro superior a direita. Em seguida, foram analisadas a expressão de Notch 1, Notch 2, CXCR3 e CCR6 nas populações de células T CD4⁺ (verde) e células T CD8⁺ (Azul) representados na forma de histograma nos quadros na parte inferior. As análises foram realizadas através do citômetro LRS II Fortessa.

Figura 5. Estratégias de gates utilizadas para identificação das subpopulações de monócitos em PBMCs.

Avaliação da expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos. No primeiro quadro à esquerda está apresentada a aquisição no citômetro e análise por tamanho (FSC-A), complexidade (SSC-A) e a *gate* (P1) é correspondente à população de monócitos. A partir da *gate* de monócitos, avaliamos as subpopulações de monócitos: CD14⁺⁺ CD16⁻ (monócitos clássicos) (Rosa); CD14⁺⁺ CD16⁺ (monócitos intermediários) (Roxo) e CD14⁺ CD16⁺⁺ (monócitos não-clássicos) (Azul) representados na forma na *dot plot* no quadro superior a direita. Em seguida, foi analisada a expressão de DLL1 e DLL4 nas três subpopulações de monócitos representados na forma de *dot plots* nos quadros na parte inferior. As análises foram realizadas através do citômetro LRS II Fortaleza.

4.4. Obtenção de *Mycobacterium tuberculosis*

Todos os procedimentos envolvendo infecção *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis* foram desenvolvidos na sala de segurança biológica nível 3 da FMRP -USP. Os experimentos envolvendo amostras de sangue humano, desde que não infectados *in vitro* com as bactérias, foram todos realizados em cabine de biossegurança nível 2 presente no laboratório de Imunologia e Epigenética da FCFRP. Todos os procedimentos seguiram as regras de biossegurança estabelecidas no país para manipulação de amostras biológicas, com devido treinamento e utilização de EPIs e EPCs.

Para realização dos ensaios *in vitro*, utilizou-se cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC[®] 27294[™], Rockville, MD), gentilmente cedida à pesquisa pelo Prof. Dr. Célio Lopes Silva. As cepas de 3^o geração armazenadas a -70°C, foram repicadas em meio líquido 7H9 enriquecido com Middlebrook ADC[™] (BD Biosciences, Sparks, USA) e

incubadas a 37°C por 10 - 11 dias para crescimento bacteriano. No 10º - 11º dia de cultura, a suspensão micobacteriana foi centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos, a 4°C. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante, o pellet ressuspense em 1 mL de PBS 1x e transferido para um tubo de vidro contendo pérolas de vidro. Agitamos a suspensão no vórtex para desmanchar os grumos até que a suspensão se tornou homogênea e utilizamos como parâmetro de comparação a escala de McFarland nº 1, que corresponde à concentração de 1×10^7 bacilos/mL. A suspensão foi diluída com PBS 1x até atingir a mesma turbidez da escala. Uma vez ajustada a concentração, a suspensão bacteriana foi centrifugada e ressuspensa em RPMI completo para obtenção de inóculo de MOI 5.

4.5. Avaliação da via Notch durante a infecção *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*

A suspensão de células mononucleares isoladas de sangue periférico de indivíduos controle foi ajustada para a concentração de 2×10^6 /poço em meio de cultura RPMI 1640 (GibcoBRL), suplementado com 10% de soro bovino fetal (RPMIc) e em seguida distribuída em placa de 48 poços (400 µL/poço). Posteriormente, as células foram tratadas com moduladores da via de sinalização Notch, dentre os quais: Deshydroxy LY- 411575 (GSI-I), (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) - inibidor da γ -secretase, anticorpos anti-hDLL1 (R&D systems, R&D Systems, Minneapolis, EUA) e anti-hDLL4 (conforme descrito por Robert Smith e colaboradores, 1994) que são bloqueadores das vias de sinalização *Notch* e com proteínas recombinantes DLL1 (DLL1r), (R&D Systems, Minneapolis, EUA), e DLL4 (DLL4r), (R&D Systems, Minneapolis, EUA). As concentrações utilizadas para os tratamentos foram de 10µM para GSI [12], [15], 5µg/mL para o anticorpo anti-DLL1 e 10µM/mL para DLL4. As proteínas recombinantes foram utilizadas na concentração de 1 µg/mL. Antes da infecção as PBMCs foram previamente incubadas ou não com o GSI, com os anticorpos anti-hDLL1 e hDLL4 e com as proteínas recombinantes por 24 horas. Após período de tratamento, as células foram infectadas com Mtb (MOI 5) e mantidas em cultura por diferentes tempos, variando de 24 a 72 horas, para avaliação da produção de citocinas, polarização celular e expressão gênica. Nas últimas 4 horas de infecção, as células foram estimuladas com phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) 50ng/mL e ionomicina 500ng/mL. Assim, após os referentes períodos de incubação, o sobrenadante das culturas foi coletado para dosagem de citocinas e o *pellet* celular foi destinado para extração de mRNA.

4.6. Ensaio para detecção de citocinas

A quantificação de citocinas e quimiocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-8, RANTES e IP-10) foi realizada em amostras de plasma, obtidas de indivíduos controle e de pacientes com tuberculose ativa, bem como no sobrenadante de cultura de PBMCs tratadas e infectadas *in vitro* com Mtb. Os ensaios de detecção foram realizados na plataforma multiplex utilizando o kit Magnetic Luminex Assay (R&D Systems a biotechne brand, Minneapolis, EUA) analisada em leitor de placas (Luminex Multiplexing Instrument - EMD Millipore, Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Conforme a metodologia do fabricante, as amostras foram adicionadas às placas específicas para o ensaio e diluídas em tampão fornecido pelo kit e, após a incubação com microesferas magnéticas fluorescentes recobertas por anticorpos de captura, foi realizado a leitura das amostras no equipamento. O *software* Milliplex Analyst® identificou cada microesfera e quantificou a fluorescência emitida nas amostras e na curva padrão do kit, associando estes valores à quantidade de cada analito.

4.7. Ensaio para detecção de CD163 e CD14 solúveis em amostras de plasma

Os níveis de CD163 e CD14 solúveis foram quantificados em amostras de plasma de indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa, através de ensaio imunoenzimático (ELISA - R&D Systems, Minneapolis, EUA). Para isso, foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de captura anti-CD163 e anti-CD14 humano (2 μ g/mL) em placas de 96 poços e as mesmas foram incubadas overnight à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20, solução de bloqueio foi adicionada e incubada por 2 horas, seguida de nova lavagem e adição de 100 μ L amostra (diluídas a 1:100 ou 1: 1000 em tampão bloquei pH 7,2) e curva padrão contendo concentrações conhecidas de sCD163 e de sCD14 foram com incubação de mais 2 h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e 100 μ L do anticorpo de detecção anti-CD163 e anti-CD14 humano (1 μ g/mL) foram adicionados em cada um dos poços. Após incubação por 2 h, as placas foram lavadas novamente e 100 μ L de estreptavidina-HRP foram adicionados em cada poço. Por fim, a reação foi revelada através da adição de substrato (TMB), seguida de interrupção por H₂SO₄ (2N). A absorbância das amostras e curva padrão foram lidas espectofotômetro de placa a 450 nm (μ Quant, Biotek Instruments Inc) e as concentrações de CD163 e CD14 solúveis foram determinadas através da curva de regressão linear obtida.

4.8. Avaliação da fagocitose e da atividade microbicida

A suspensão de PBMCs isoladas de indivíduos controle foram ajustadas em meio de cultura RPMIc e distribuída em placa de 96 poços com 1×10^6 células por poço, em volume de 100 μ L/poço. Em seguida, as células foram tratadas com os anticorpos anti-hDLL1 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) na concentração de 5 μ g/mL e anti-hDLL4 (conforme descrito por Robert Smith e colaboradores, 1994) na concentração de 10 μ g/mL e incubadas a 37°C por 24 horas. Após período de tratamento, foi realizada a infecção utilizando cepas H37Rv de Mtb. Para avaliação da atividade fagocítica e microbicida as células foram distribuídas em duas placas diferentes, com diferentes tempos de incubação. Desta forma, a placa de fagocitose foi incubada por 2 horas, enquanto que a placa de atividade microbicida permaneceu em incubação por 24 horas.

Para avaliação da fagocitose, após período de 2 horas de cultura, o sobrenadante da placa foi coletado e a mesma foi lavada com PBS 1x a temperatura ambiente por 2 vezes, para remoção das bactérias não internalizadas pelas células. Posteriormente foi adicionado 200 μ L de uma solução de saponina (0,05%) para lise celular e liberação das bactérias fagocitadas, seguida da adição 10 μ L de resazurina (0,5mg/ml), que será então metabolizada pelas bactérias viáveis e promoverá a conversão de resazurina e resaforina, com conseqüente alteração da coloração de azul a rosa. Por sua vez, para avaliação da atividade microbicida, após 24 de infecção, foram adicionados 25 μ L de uma solução de saponina 8x (0,4%) concentrada, seguida de adição de 10 μ L de resazurina (0,5mg/ml). A leitura das placas foi realizada no espectrofluorímetro (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices) com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm, 24 horas após adição de resazurina.

4.9. Extração de RNA total das PBMCs, síntese de cDNA e PCR em tempo real

Para avaliação da expressão gênica foi realizada inicialmente a extração do RNA mensageiro através do kit de extração PureLinkTM RNA Mini Kit (Ambion, Life TechnologiesTM, Carlsbad, USA). Conforme a metodologia do fabricante, ao pellet celular foi adicionado tampão de lise, contendo 1% de 2-mercaptoetanol (600 μ l) (1%). Em seguida, a amostra foi agitada no vortex por aproximadamente 45 segundos e centrifugada a 12000 gx, 18 ° C por 2 minutos. Posteriormente foi adicionado o mesmo volume de etanol 70%, homogeneizou-se com pipeta e a amostra foi transferida para coluna de purificação e centrifugada a 12000 gx, 18 ° C por 15 segundos. Uma vez retido na coluna, o RNA passa por etapas de lavagens com tampões específicos, fornecidos pelo fabricante. Por fim, é

adicionado 50 µl de H₂O *nuclease free* e centrifugada a < 12000 gx, 18°C por 2 minutos para recuperar o RNA, que é armazenado à -80°C. A quantificação do material obtido foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop® 2000.

Para que fosse possível a realização do PCR em tempo real cada 1000 ng de RNAm foram convertidos em cDNA por meio de kit cDNA High Capacity Archive (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Sendo assim, o RNAm foi incubado com 2 µL de tampão RT 10X fornecido, 0,8 µL de dNTP Mix, 2 µL de random primers 10X e 1 µL da enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ µL), acrescidos de água livre de endonucleases para um volume final de reação de 20 µL. A reação foi realizada em termociclador num ciclo de incubação por 10 minutos à 25 °C, 2 horas à 37 °C e 5 minutos à 85 °C.

Finalmente, a avaliação da expressão de genes relacionados à ativação da via Notch e da resposta imune foi determinada através de reação de PCR em tempo real. Os genes avaliados foram IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-10, IL-21, TGF-β, DTX, HES1 e HEY1 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A reação foi construída através da adição de 1 µL de cDNA, 10 µL de Master Mix GoTaq® Probe 2-Step RT-qPCR System (Promega) 1 µL do primer e 8 µL de água livre de endonucleases para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada em equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA), sendo as condições de amplificação: 20 segundos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 1 segundo a 37 °C e 20 segundos a 60 °C. O gene constitutivo GAPDH foi utilizado para normalização dos resultados de CT (*cycle threshold*) obtidos. A partir de tais resultados, calculou-se a expressão relativa para cada gene utilizando método comparativo.

4.10. Avaliação da lesão pulmonar dos pacientes com tuberculose ativa

Os pacientes com tuberculose ativa foram classificados de acordo com o grau de lesão pulmonar, pelo Prof. Dr. Valdes Bolela em ensaio cego, de acordo com a extensão da doença evidenciada através de exames radiológicos (Raio-X e Tomografia Computadorizada). A doença foi considerada mínima (estágio 1), moderada (estágio 2) e avançada (estágio 3) segundo critérios descritos por Abakay O. e colaboradores [84].

Baseados nesta classificação, as lesões foram consideradas mínimas (grau 1), quando não houve evidência de cavitação e a densidade foi classificada como ligeira ou moderada, estando localizada acima da segunda junção condroesternal. Em adição, tais lesões só poderiam envolver um segmento de um ou ambos os pulmões e a extensão das lesões combinadas não ultrapassavam o volume de um único pulmão.

Na doença moderada (grau 2), as lesões eram densamente acumuladas e confluentes, porém as áreas de lesões de alta densidade não poderiam ocupar mais de um terço do volume de um pulmão. Além disso, quando detectadas cavitações, o diâmetro total não excedeu 4 cm em pacientes classificados neste estágio.

Finalmente, para a classificação do paciente em doença avançada (grau 3), considerou-se casos em que as lesões encontradas apresentassem extensão maior do que a encontrada nos casos considerados moderados pela classificação utilizada.

Tabela 3. Classificação dos pacientes com tuberculose ativa

Grupos	Controle	Pacientes TB. A
Número de indivíduos	13	13
Esfregação de expectoração		
+	NA	7
++	NA	0
+++	NA	1
Negativo	NA	4
Grau de lesão pulmonar		
1-Mínimo	NA	4
2-Moderado	NA	1
3-Avançado	NA	7

N.A. não avaliado

4.11. Análise estatística

As análises foram realizadas com auxílio dos programas estatísticos GraphPad Prism 6.0. e o IBM SPSS Statistics 21. Os testes para análise foram escolhidos de acordo com a distribuição dos dados através do teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov with Dallal-Wilkinson-Lilliefors P value*. Para as dados considerados paramétricos utilizamos o *test* e para os dados não paramétricos utilizamos o teste *Mann-Whitney*. Para todos os testes foram considerados significativos valores de *p* menor ou igual a 0,05 (*Two tailed*). As correlações entre os dados foram realizadas por meio dos testes de correlações de *Kendall's tau-b* e *Spearman*.

Os resultados relacionados à expressão gênica de citocinas e genes relacionados a via Notch avaliados em PBMCs, foram utilizados para obter uma análise de bioassinatura. Para isso, em todos os dados foram empregados o cálculo da mediana global de cada gene alvo, a qual foi utilizada como ponto de corte na classificação dos indivíduos em “baixos” e “altos” produtores. Uma vez determinados os pontos de corte e selecionados os altos produtores de

cada indicador, os resultados foram representados nas formas de diagramas e as frequências destes foram determinadas para cada grupo de estudo. Gráficos de radar foram construídos no Microsoft Excel (Microsoft Office 2013, Las Vegas, EUA) para caracterizar a frequência global de indivíduos com níveis elevados de cada marcador. O número (n) de indivíduos variou de acordo com o experimento realizado, estando o mesmo descrito na legenda das figuras.

5. RESULTADOS

5.1. Expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em células T de pacientes com tuberculose ativa

Para compreender a participação da via de sinalização Notch na tuberculose, iniciamos as avaliações através da análise fenotípica da expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em células T CD4⁺ e T CD8⁺ de paciente com tuberculose ativa. Para isso, foram obtidas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) para verificarmos a expressão dos receptores através de citometria de fluxo. Nesse sentido, quando avaliamos a frequências destas células, verificou-se que pacientes com tuberculose ativa têm diminuição significativa no número de células T CD4⁺ quando comparado aos indivíduos controle, enquanto nenhuma diferença foi observada em relação ao número de células T CD8⁺ nestes pacientes (Figura 6A). Por conseguinte, avaliamos a expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 nestas populações celulares e constatamos que não há diferenças significativas na frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ que possuem esses receptores (Figuras 6B e 6D). Porém, ao analisarmos a intensidade média de fluorescência (IMF), observamos que células T CD8⁺ de pacientes apresentaram diminuição significativa na expressão do receptor Notch 2 (Figura 6E) ao passo que nenhuma diferença foi observada em relação às células T CD4⁺ (Figura 6C). Ainda, avaliamos os perfis de ativação dessas células por meio da expressão dos receptores CXCR3 e CCR6, considerados marcadores de ativação de células Th1 (*T-helper 1*) e Th17 (*T-helper 17*), respectivamente. Dessa forma, observamos uma diminuição significativa na frequência de células positivas para o receptor CXCR3 nas duas populações de células T dos pacientes com tuberculose. Em relação à expressão de CCR6, por sua vez, não foram observadas diferenças significativas na expressão do receptor, porém observamos uma forte tendência na expressão desse receptor em pacientes com tuberculose ativa (Figura 6B e 6D). Sendo assim, sugerimos, com base nos resultados apresentados, que nos pacientes com TB ativa, a expressão do receptor Notch 2 é modulado negativamente em células TC8⁺ e células do perfil Th1 são menos ativadas, tendo em vista a redução significativa na expressão de CXCR3.

Figura 6. Expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em linfócitos de pacientes com tuberculose ativa. A expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 foi caracterizada em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa por citometria de fluxo. **A)** Distribuição das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. **B e C)** Frequência (%) e expressão (Intensidade Média de Fluorescência - IMF) dos receptores Notch 1, Notch 2, CXCR3 e CCR6 na população de linfócitos T CD4⁺. **D e E)** Frequência (%) e expressão (IMF) dos receptores Notch 1, Notch 2, CXCR3 e CCR6 na população de linfócitos T CD8⁺. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo. Indivíduos controle (n=11) e pacientes com TB ativa (n=12) na avaliação de Notch1, Notch2 e CXCR3. Para avaliação da expressão de CCR6, grupo controle (n=6) e tuberculose ativa (n=5). Os resultados foram analisados através do *t test*. *** $P < 0,0005$, ** $P < 0,005$, * $P < 0,05$.

5.2. Expressão dos ligantes Notch, DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos de pacientes com tuberculose ativa

Uma vez determinada a expressão dos receptores em linfócitos de pacientes com TB ativa, realizamos também a avaliação da expressão dos ligantes Notch, DLL1 e DLL4, em monócitos. Além da expressão dos ligantes, também caracterizamos as diferentes subpopulações de monócitos através da expressão de CD14 e CD16. Sendo assim, observamos que pacientes com TB ativa apresentam aumento significativo na frequência de células $CD14^+ CD16^{++}$, classificadas como monócitos não-clássicos, em relação aos monócitos dos indivíduos controle (Figura 7A). Em adição, o número de células $CD14^{++} CD16^-$ (monócitos clássicos) e $CD14^{++} CD16^+$ (monócitos intermediários), apesar de não serem estatisticamente diferentes, também estavam aumentados em pacientes com TB ativa (Figura 7A).

Uma vez caracterizadas as subpopulações de monócitos, avaliamos a expressão dos ligantes de Notch, DLL1 e DLL4. Observamos aumento significativo no número de células $CD14^{++} CD16^+$ (monócitos intermediários) e de células $CD14^+ CD16^{++}$ (monócitos não-clássicos) que expressam o ligante DLL4 em pacientes com TB ativa em comparação aos indivíduos controle. (Figuras 7D e 7F). Além disso, evidenciamos diminuição significativa da expressão do ligante DLL1 em células $CD14^+ CD16^{++}$ duplo positiva. Em contrapartida, não observamos diferenças na expressão do ligante DLL1 nas demais subpopulações de monócitos. Sendo assim, demonstramos participação da via durante a infecção por Mtb, visto a modulação na expressão dos receptores e ligantes nas células mononucleares, evidenciadas aqui pelo aumento na DLL4 em subpopulações de monócitos.

Figura 7. Expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos de pacientes com tuberculose ativa. Células mononucleares de indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa foram marcadas com anticorpos para CD16 e CD14, para avaliação das subpopulações de monócitos divididos em monócitos clássicos (CD14⁺⁺ CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺ CD16⁺⁺). A expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 foi caracterizada nessas populações. **A)** Distribuição de subpopulações de monócitos. **B e C)** Frequência (%) e expressão (IMF) dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos clássicos. **D e E)** Frequência (%) e expressão (IMF) dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos intermediários. **F e G)** Frequência (%) e expressão (IMF) dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos não-clássicos. (DP) células duplo positivas para expressão do ligante DLL1 e DLL4. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo. Indivíduos controle (n=11) e pacientes com TB ativa (n=12). Os resultados foram analisados através do *t test*; ** $P < 0,005$, * $P < 0,05$.

5.3. Avaliação da expressão gênica e dos níveis plasmáticos de citocinas em pacientes com tuberculose ativa

A produção e liberação de citocinas por células da imunidade inata e adaptativa durante a infecção por Mtb são essenciais para o controle da doença. Em pacientes com tuberculose ativa essas respostas não se restringem ao sítio de infecção, mas também são direcionadas para circulação. Além disso, alterações na produção de citocinas podem refletir diretamente na progressão da doença. Nesse cenário, alguns grupos de pesquisa têm evidenciado a capacidade da sinalização Notch em alterar os perfis de resposta inflamatória, principalmente respostas relacionadas à imunidade adaptativa. Visto a modulação na expressão dos receptores e ligantes em pacientes com tuberculose ativa e sabendo da participação da via Notch na polarização celular, e consequentemente no padrão de citocinas produzidas, buscamos avaliar o perfil de mediadores nestes pacientes.

Sendo assim, para avaliar a participação da ativação da via de sinalização Notch e as possíveis alterações nos perfis de resposta imune sistêmica em pacientes com TB ativa, buscamos determinar a modulação na produção destes mediadores, bem como de outros genes relacionados à ativação desta via através de detecção da expressão gênica em células mononucleares e da quantificação de mediadores no plasma destes pacientes. Inicialmente, ao avaliar a expressão gênica em células mononucleares, não foi possível observar diferenças significativas em relação a expressão gênica. Nenhuma diferença foi demonstrada em genes relacionados à via Notch, como HES 1 e DTX, os quais indicam a ativação dos mecanismos de sinalização intracelular (Figuras 8A e 8B). E de maneira semelhantes, genes que determinam o padrão de resposta imune, como IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-10 e TGF- β (Figuras 8C-J) também não apresentaram alteração na expressão quando comparamos os pacientes com TB ativa com os indivíduos controle.

Figura 8. Expressão gênica de alvos de Notch e de citocinas em PBMCs de pacientes com tuberculose ativa. Foram realizadas as extrações de RNA e análises das expressões gênicas das PBMCs de indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa. **A e B)** Expressão de genes envolvidos com a via Notch (HES 1 e DTX). **C–H)** Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-17F e IL-21). **I e J)** Expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo e cada ponto é representativo de um indivíduo. O número de indivíduos utilizados nesse experimento variou por grupo dependendo de cada alvo (n= 7 a 13). Os resultados foram analisados através do *t test*.

Apesar de não ser observadas diferenças na expressão gênica dos alvos analisados e pela ampla variação na expressão dentro dos grupos, utilizamos os resultados para construir análise de bioassinatura. Nesta análise a frequência de indivíduos com elevada expressão do gene alvo, caracterizados como “altos produtores”, é determinada a partir da mediana global calculada para cada gene de interesse (Figura 9). Com base nesta avaliação, podemos constatar que mais de 50% dos pacientes com TB ativa foram considerados altos produtores para TNF- α , IL-17A, IL-6, TGF- β , IL-10, HES-1 e DTX, com frequências de 54, 57, 50, 62, 54, 58 e 53%, respectivamente (Figura 9B). Enquanto no grupo controle, observamos altos produtores apenas para IFN- γ , IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-6, com frequências de 64, 50, 71, 67 e 54%, respectivamente (Figura 9A). Vale ressaltar, que diferente dos pacientes com TB ativa, os indivíduos controle não foram considerados altos produtores para genes relacionados à ativação da via Notch (HES-1 e DTX).

Figura 9. Assinatura global da expressão gênica de alvos Notch e citocinas de pacientes com tuberculose ativa. Os dados de expressão gênica dos alvos de Notch e de citocinas foram representados na forma de gráficos de radar, onde as frequências (%) foram determinadas através do valor da mediana global de cada gene alvo como ponto de corte para determinar os indivíduos com níveis “baixos” ou “altos” de um determinado alvo. Os gráficos de radar assumem que cada eixo mostra a proporção de indivíduos com níveis altos de determinado gene alvo. Os valores relevantes ($\geq 50\%$) estão indicados (*). **A)** Representação dos indivíduos controle (preto). **B)** Representação dos pacientes com tuberculose ativa (cinza).

Uma vez avaliada a expressão de genes envolvidos com a via Notch e citocinas importantes para a resposta imune em PBMCs, analisamos também os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-8, RANTES e IP-10 presentes no plasma desses pacientes. Observar uma diminuição significativa dos níveis de IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-1 β e RANTES em pacientes com TB ativa quando comparados com indivíduos controle

(Figuras 10A, 10C-10E, 10G e 10K). Em contrapartida, observamos aumento significativo nos níveis de IL-6 e IP-10 em pacientes com TB ativa (Figuras 10H e 10L), sugerindo que os pacientes com tuberculose ativa apresentam alterações importantes no perfil de citocinas plasmáticas, as quais podem estar sob influência das alterações observadas na ativação na via Notch nestes indivíduos. Ainda, nenhuma diferença foi observada em relação aos níveis de TNF- α , IL-12, IL-8 e IL-10 (Figuras 10B, 10F, 10I e 10J).

Figura 10. Quantificação dos níveis de citocinas no plasma de pacientes com TB ativa. Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, RANTES e IP-10 foram avaliados no plasma de indivíduos controle e pacientes com TB ativa através do Kit *Magnetic Luminex Assay*. As barras representam à média $\pm$ desvio padrão de cada grupo e cada ponto é representativo de um indivíduo. Grupo controle (n=13) e pacientes com TB ativa (n=13). Os resultados foram analisados através do *t test*. **** $P < 0,0005$, ** $P < 0,005$, * $P < 0,05$.

5.4. Biomarcadores plasmáticos associados à ativação de monócitos detectados no plasma de pacientes com tuberculose ativa

Além das citocinas e quimiocinas, outros mediadores plasmáticos já foram descritos por atuarem como biomarcadores de ativação da resposta imune em diversas doenças. Dentre os marcadores plasmáticos se encontram aqueles que indicam o estado de ativação de células do sistema imune, como os monócitos, alvos de estudo neste trabalho. Sabe-se que durante o desenvolvimento da TB os monócitos desempenham papel importante, sendo recrutados para o sítio de infecção com o intuito de controlar a propagação dos bacilos. Neste cenário, o estado de ativação dessas células e a capacidade em controlar a infecção influenciam diretamente o desfecho e a progressão da doença.

Vários estudos têm reportado que constituintes solúveis provenientes de monócitos, como CD14 (CD14s) e CD163 (CD163s) solúveis, podem ser possíveis biomarcadores, já que são detectados em fluidos biológicos e podem inferir o estado de ativação dessas células. Ademais, avaliamos os níveis de CD14s e CD163s no plasma de pacientes com TB ativa e observamos níveis elevados de ambos os mediadores quando comparados aos indivíduos controle (figuras 11A e 11B), indicando que monócitos de pacientes com tuberculose estão sistemicamente ativados.

Figura 11. Quantificação de níveis plasmáticos de CD14s e CD163s em indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa. Os níveis de CD14s (A) e os níveis de CD163s (B) foram dosados no plasma de indivíduos controle e pacientes com tuberculose ativa através de ELISA. As barras representam à média $\pm$ desvio padrão de cada grupo e cada ponto é representativo de um indivíduo. Para CD14s foram avaliados indivíduos controle (n=13) e pacientes com tuberculose ativa (n=13) e para CD163s indivíduos controle (n=6) e pacientes com tuberculose ativa (n=13). Os resultados foram analisados através do *t test*. **** $P < 0,0005$, ** $P < 0,005$.

5.5. Associações entre via Notch, mediadores imunológicos e a progressão da tuberculose

Visto a modulação nos receptores e ligantes encontrados nos pacientes com tuberculose ativa, bem como as alterações no perfil de citocinas, e consequentemente nos padrões de resposta imune, buscamos avaliar a interação entre a via de sinalização Notch e a progressão da tuberculose. Para isso, baseados nos resultados obtidos até o momento, a expressão dos receptores Notch 1 e 2 em células T e dos ligantes DLL1 e DLL4 em monócitos de pacientes com TB ativa foram associados com a gravidade da TB, determinada através de dados clínicos, como exames de raio x e radiografia computadorizada. Tais parâmetros permitiram a classificação dos pacientes em três categorias, levando em consideração a extensão da lesão pulmonar (Tabela 3 – Item 4.10 – Material e métodos).

Assim, determinamos inicialmente a relação existente entre a expressão dos receptores Notch, presente nos linfócitos, com o grau de lesão pulmonar, sendo possível observar que a expressão do receptor Notch 1 em células T CD4⁺ apresentou correlação positiva com o grau da lesão pulmonar (Tabela 4).

Tabela 4. Correlações da expressão dos receptores Notch 1 e 2 com grau de lesão pulmonar de pacientes com tuberculose

		GRAU DE LESÃO PULMONAR	
		Coefficiente de correlação	<i>p</i>
Células T CD4⁺	Notch 1 ⁺ (%)	0,690	0,006**
	Notch 2 ⁺ (%)	-0,217	0,384
	Notch 1 ⁺ (IMF)	0,611	0,014*
	Notch 2 ⁺ (IMF)	-0,138	0,580
Células T CD8⁺	Notch 1 ⁺ (%)	0,296	0,235
	Notch 2 ⁺ (%)	-0,177	0,476
	Notch 1 ⁺ (IMF)	0,296	0,235
	Notch 2 ⁺ (IMF)	0,296	0,235

Pacientes com tuberculose ativa (n=12). As análises foram realizadas através do teste de *Kendall's tau-b*.

***P*<0,01; **P*<0,05.

Corroborando o resultado da análise de correlação, após realizarmos a distribuição desses pacientes levando em consideração o grau de lesão pulmonar, foi possível evidenciar que pacientes com quadros de lesão pulmonar moderado e avançado apresentaram maior expressão do receptor Notch 1 quando comparados aos pacientes com grau mínimo de lesão (Figura 12A e 12B).

Figura 12. Associação da expressão do receptor Notch 1 em células T CD4⁺ com quadros mais graves de lesão pulmonar. A expressão do receptor Notch 1 em células T CD4⁺ foi avaliada de acordo com grau de lesão pulmonar. Para isto os pacientes foram classificados em grau mínimo e grau moderado/avançado. **A)** Frequência e **B)** Intensidade média de fluorescência. As análises foram realizadas através do *t test*. Cada ponto é representativo de um indivíduo. Pacientes com tuberculose ativa (n=12). **p* < 0,05.

Além dos receptores, também observamos importantes correlações entre a progressão da tuberculose e a expressão dos ligantes nos monócitos. Assim, determinamos que, de maneira complementar ao observado com o receptor Notch1, a expressão do ligante DLL4 em células CD14⁺⁺CD16⁺ também se relaciona positivamente com o maior grau de lesão pulmonar (Tabela 5). Desta maneira, com base no exposto, inferimos que o aumento da expressão dos constituintes da via Notch, como Notch1 e DLL4, estão diretamente associados com quadros mais graves de tuberculose.

Tabela 5. Correlações da expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 com grau de lesão pulmonar de pacientes com tuberculose

		GRAU DE LESÃO PULMONAR	
		Coefficiente de correlação	<i>p</i>
CD14⁺⁺CD16⁻	DLL1 ⁺ (%)	0,126	0,629
	DLL4 ⁺ (%)	0,374	0,133
	DLL1 ⁺ (IMF)	0,177	0,476
	DLL4 ⁺ (IMF)	0,414	0,097
CD14⁺⁺CD16⁺	DLL1 ⁺ (%)	-0,200	0,427
	DLL4 ⁺ (%)	0,138	0,580
	DLL1 ⁺ (IMF)	-0,020	0,937
	DLL4 ⁺ (IMF)	0,493	0,048*
CD14⁺CD16⁺⁺	DLL1 ⁺ (%)	-0,181	0,498
	DLL4 ⁺ (%)	0,099	0,692
	DLL1 ⁺ (IMF)	-0,112	0,672
	DLL4 ⁺ (IMF)	0,256	0,304

Pacientes com tuberculose ativa (n=12). As análises foram realizadas através do teste de *Kendall's tau-b*.

**P* < 0,05.

Assim como observado acima, para os receptores e ligantes, sabe-se que durante infecções crônicas, como na TB, diversas citocinas são produzidas por células do sistema imune visando à defesa dos organismos, porém em determinadas situações onde não há uma regulação minuciosa desses processos, as respostas mediadas por citocinas podem se tornar prejudiciais para o organismo e auxiliar na progressão da doença. Nesse sentido, sabemos que a via de sinalização Notch é capaz de modular a ativação do sistema imune em diferentes perfis, dessa forma é importante determinar também se as alterações na produção de citocinas observadas nos pacientes podem estar relacionadas à expressão diferencial dos componentes da via, bem como estas alterações podem ser indicativos de progressão da tuberculose.

Sendo assim, buscamos avaliar se os níveis de citocinas plasmáticas detectadas em pacientes com TB poderiam estar associados com o desenvolvimento de quadros mais grave da doença. Observamos que os níveis plasmáticos de IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1 β , RANTES e IL-10 se correlacionaram positivamente com o maior grau de lesão pulmonar (Tabela 6).

Tabela 6. Correlações dos níveis de citocinas plasmáticas com grau de lesão pulmonar de pacientes com tuberculose

	GRAU DE LESÃO PULMONAR	
	Coefficiente de correlação	<i>p</i>
IFN- γ	0,695	0,006**
TNF- α	0,596	0,017*
IL-17A	0,735	0,003**
IL-4	0,706	0,005**
IL-2	0,695	0,006**
IL-12	0,701	0,005**
IL-1 β	0,695	0,006**
IL-6	0,453	0,069
IL-8	0,377	0,132
IL-10	0,650	0,009**
RANTES	0,690	0,006**
IP-10	0,159	0,526

Pacientes com tuberculose ativa (n=12). As análises foram realizadas através do teste de *Kendall's tau-b*.

** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Em seguida, os níveis destes mediadores presentes no plasma de pacientes com tuberculose ativa foram examinados a fim de relacioná-los com a expressão de receptores e ligantes Notch. De forma interessante, constatamos que os níveis de IFN- γ , IL-17A, IL-1 β , IL-4 e IL-2 apresentaram correlação positiva com maior expressão do receptor Notch 1 em células T CD4⁺ (Figuras 13A–J), enquanto que níveis plasmáticos de IP-10, CD163s e de

procalcitonina se relacionam positivamente com maior expressão de Notch 1 em células T CD8⁺ (Figuras 13K–N).

Figura 13. Correlação entre expressão do receptor Notch 1 em células T e mediadores imunológicos em pacientes com tuberculose ativa. A expressão do receptor Notch 1 em células T CD4⁺ foi correlacionada positivamente com níveis plasmáticos de (A e B) IFN- γ , (C e D) IL-17A, (E e F) IL-2, (G e H) IL-1 β e (I e J) IL-4. A expressão do receptor Notch 1 em células T CD8⁺ foi correlacionada positivamente com níveis plasmáticos de (K e L) IP-10, (M) CD163s (N) procalcitonina. As análises foram realizadas através do teste estatístico de *Spearman*. Cada ponto é representativo de um indivíduo e os valores de *r* e *p* estão especificados nos gráficos. Pacientes com tuberculose ativa (n=12).

Ademais, níveis de IL-17A se relacionam com maior expressão de DLL4 em células CD14⁺⁺CD16⁻ e CD14⁺⁺CD16⁺ (Figuras 14A e 14B). Os resultados obtidos até o momento, com avaliações sistêmicas, nos permitem sugerir que a via Notch tem participação importante durante a tuberculose ativa, tendo em vista a associação dos seus receptores e ligantes aos quadros mais graves da doença (Figura 15).

Figura 14. Correlação entre expressão do ligante DLL4 em monócitos clássicos e intermediário e níveis plasmáticos de IL-17A. A expressão dos ligantes DLL4 foi correlacionada positivamente com os níveis plasmáticos de IL-17A de pacientes com tuberculose ativa. (A) Correlação positiva entre expressão (IMF) de DLL4⁺ em monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ e níveis plasmáticos de IL-17A (B) Correlação positiva entre expressão (IMF) de DLL4⁺ em células CD14⁺⁺CD16⁺ e níveis plasmáticos de IL-17A. As análises foram realizadas através do teste estatístico de *Spearman*. Cada ponto é representativo de um indivíduo e os valores de *r* e *p* estão especificados nos gráficos. Pacientes com tuberculose ativa (n=12).

Figura 15. Esquema dos resultados encontrados na 1ª parte deste trabalho. A sinalização Notch é modulada de forma sistêmica, em células mononucleares do sangue periférico, de pacientes com tuberculose ativa. Além disso, citocinas pró- e anti-inflamatórias se encontram alteradas desses pacientes. Em adição, a expressão de Notch 1, DLL4 e mediadores inflamatórios foram associados com a gravidade da TB. (↔) correlação positiva; (↑) aumento (↓) redução na expressão/produção.

5.6. Expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em células T após interação com Mtb

O desenvolvimento da TB induz no organismo vários mecanismos imunes, sistêmicos e locais (sítio de infecção) importantes para a progressão da doença. A interação do Mtb com células do sistema imune e o microambiente inflamatório podem induzir alterações nos perfis de respostas celulares diferentes do observado em respostas sistêmicas. Assim, como forma de compreender melhor a função da ativação desta via, propusemos analisar o papel da interação dos receptores e ligantes Notch no sítio da infecção, usando para isto modelo de infecção *in vitro*.

Nesse sentido, após avaliarmos a expressão sistêmica de receptores Notch 1 e Notch 2 em células T CD4⁺ e T CD8⁺ de paciente com tuberculose ativa, analisamos a capacidade do Mtb em modular a expressão dos receptores Notch em células que entram em contato com os bacilos. Para isso, PBMCs de indivíduos saudáveis foram infectados com cepas de Mtb H37Rv durante 72 horas e a expressão dos receptores avaliada por citometria de fluxo (Figura 16). Diferente do observado anteriormente em células periféricas de pacientes com TB. ativa, evidenciamos aumento significativo no número de células T CD4⁺ na condição infectada com H37Rv quando comparada à condição controle. No entanto, não houve diferenças em relação ao número de células T CD8⁺ (Figura 16A). Ao avaliarmos a expressão dos receptores Notch, observamos um aumento significativo na frequência de células T CD4⁺ que expressam o receptor Notch 2 na condição infectada (Figura 16B), porém não foram observadas diferenças na IMF (Figura 16C). Além disso, não evidenciamos diferenças na expressão do receptor Notch 1 em células T CD4⁺ e T CD8⁺ em ambas condições (Figuras 16B-E).

Adicionalmente, ao avaliarmos os perfis de ativação dessas células, através da expressão de CXCR3 e CCR6, observamos aumento significativo na frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas para o receptor CXCR3 quando infectadas pelo bacilo (Figuras 16B e 16D), porém não foram observadas diferenças na IMF (Figuras 16C e 16E). Por fim, não se observou alterações na expressão do receptor CCR6 em células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figuras 16B-E). Dessa forma, temos indícios de que o Mtb modula a expressão de receptores Notch em linfócitos no sítio de infecção.

Figura 16. Expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 em linfócitos após infecção com Mtb H37Rv. A expressão dos receptores Notch 1 e Notch 2 foi caracterizada em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos controle após infecção *in vitro* com Mtb H37Rv por 72 horas. **A)** Distribuição das populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. **B e C)** Frequência (%) e expressão (Intensidade Média de Fluorescência - IMF) dos receptores Notch 1, Notch 2, CXCR3 e CCR6 na população de linfócitos T CD4⁺. **D e E)** Frequência (%) e expressão (IMF) dos receptores Notch 1, Notch 2, CXCR3 e CCR6 na população de linfócitos T CD8⁺. (n=6). Os resultados foram analisados através do *t test*. *****P*<0,0005, ***P*<0,005, **P*<0,05.

5.7. Expressão dos ligantes Notch, DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos após interação com Mtb

Após avaliarmos a expressão dos receptores em linfócitos, realizamos análises da expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 em monócitos. A partir disso, observamos aumento significativo no número de células $CD14^+ CD16^{++}$ (monócitos não-clássicos) quando as células foram infectadas com H37Rv em comparação ao controle (Figura 17A). Em adição, é possível observar diminuição significativa no número de monócitos $CD14^{++} CD16^+$ (monócitos intermediários) em células infectadas com H37Rv (Figura 17A). No que concerne a expressão dos ligantes de Notch, DLL1 e DLL4, observamos aumento significativo na frequência de monócitos $CD14^+ CD16^{++}$ (monócitos não-clássicos) que expressam o ligante DLL4 dentre as células mononucleares infectadas com H37Rv quando comparadas ao controle (Figura 17D). Ademais, não foram observadas diferenças em relação a expressão do ligante DLL1 nos grupos avaliados (Figuras 17A–G). Desta forma, assim como para os receptores, há indícios de que o Mtb modula também a expressão de ligantes Notch em monócitos no sítio de infecção.

Figura 17. Expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos após infecção com Mtb H37Rv. Células mononucleares de indivíduos controle marcadas com anticorpos para CD16 e CD14, para classificar as células em monócitos clássicos ($CD14^{++} CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{++} CD16^{+}$) e não-clássicos ($CD14^{+} CD16^{++}$). A expressão dos ligantes DLL1 e DLL4 foi caracterizada nessas populações. **A)** Distribuição de subpopulações de monócitos. **B e C)** Frequência (%) e expressão (IMF) dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos clássicos. **D e E)** Frequência (%) e expressão (IMF) dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos intermediários. **F e G)** Frequência (%) e expressão (IMF) dos ligantes DLL1 e DLL4 em subpopulações de monócitos não clássicos. (DP) células duplo positiva para expressão do ligante DLL1 e DLL4. (n=6). Os resultados foram analisados através do *t test*. *** $P < 0,0005$, * $P < 0,05$.

5.8. A sinalização Notch altera a produção de citocinas durante a infecção por Mtb

Após caracterização da expressão dos receptores e ligantes da via Notch em PBMCs de pacientes com TB ativa e em modelo de infecção *in vitro*, investigamos os mecanismos envolvidos na resposta ao bacilo dependentes da ativação da via Notch. Assim, demonstramos que além do aumento da expressão de Noth2 e DLL4, também observamos tendência de aumento, apesar de não significativo, na expressão de HES1, sugerindo que a via de sinalização parece estar sendo ativada durante a infecção *in vitro* (Figura 18).

Figura 18. Expressão gênica de HES1 de PBMCs infectados com Mtb H37Rv. Células mononucleares foram isoladas de indivíduos controle e infectadas *in vitro* com Mtb H37Rv por 72 horas. Após tal período foi realizada extração de RNA e a expressão de HES1, gene alvo da ativação da via Notch, foi avaliada por qPCR em tempo real. Os resultados, expressos em barras de média $\pm$ desvio padrão, foram analisados através do *t test* com $p < 0.05$. (n=4).

Uma vez que há indícios de ativação desta via de sinalização, e sabendo do papel na modulação da produção de mediadores, como as citocinas, nosso próximo objetivo foi avaliar a participação exercida pela via na liberação destes mediadores durante a infecção por Mtb. Para tal utilizamos de estratégias de bloqueio da via através de utilização de inibidor farmacológico da via Notch (GSI), além de anticorpos bloqueadores para os ligantes, anti-hDLL1 e anti-hDLL4. Ainda, realizamos tratamentos com proteínas recombinantes, DLL1r e DLL4r, a fim de favorecer a ativação da via e assim compreender a real participação destes ligantes na modulação da resposta imune. Nestes ensaios, as células foram tratadas por 24 h com os diferentes compostos e em seguida, infectadas com H37Rv por 72 horas. Após tal período, o sobrenadante da cultura foi utilizado para avaliar níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-8, RANTES e IP-10 (Figura 19).

Podemos observar que o bloqueio da sinalização Notch, utilizando GSI, acarretou em diminuição significativa na produção de IL-17A, IL-2 e IL-10 (Figuras 19C e 19E) e em aumento nos níveis de IL-8 (Figura 19I). O bloqueio do ligante DLL4, com anti-hDLL4, leva

ao aumento dos níveis de TNF- α (Figura 19B). Já ao utilizar as proteínas recombinantes para os ligantes, a adição de DLL1r à cultura de PBMCs resultou em aumento significativo dos níveis de IL-1 β e diminuição dos níveis de IP-10 durante a infecção por Mtb (Figura 19G e 19L). Não houve nenhuma influência destes tratamentos na produção de IFN- γ , IL-4, IL-12, IL-6 e RANTES (Figuras 19A, 19D, 19F, 19H e 19K).

Figura 19. Quantificação dos níveis de citocina no sobrenadante de cultura de PBMCs infectadas com Mtb H37Rv. Os níveis de IFN-, TNF-, IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, RANTES e IP-10 foram avaliados no sobrenadante de cultura de PBMCs, previamente tratadas com GSI, anti-DLL1, anti-DLL4 e proteínas recombinantes DLL1r e DLL4r por 24 h e infectadas com Mtb H37Rv por 72h, através do Kit *Magnetic Luminex Assay*. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados através do t test. ** $P < 0,005$, * $P < 0,05$.

5.9. O bloqueio de DLL4 em monócitos favorece a fagocitose

Finalmente, visto que demonstramos a modulação dos componentes da via durante a infecção por Mtb, sugerindo a participação na ativação dos mecanismos da resposta imune, observada na regulação da produção de citocinas quando os componentes da via eram bloqueados, buscamos também avaliar o papel da sinalização Notch nos mecanismos efetores de monócitos. Sabe-se que estas células, juntamente com macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, são essenciais para eliminação dos bacilos e para ativação de resposta adaptativa. Consequentemente, a ativação de células T influencia diretamente na capacidade fagocítica e atividade microbicida de células da imunidade inata. Sendo assim, buscamos avaliar a influência dos ligantes Notch durante o processo de fagocitose e na atividade microbicida de monócitos. Para isto, as PBMCs foram previamente tratadas por 24 horas ou não com anti-hDLL1 e anti-hDLL4. Em seguida, as células foram infectadas com H37Rv e a atividade fagocítica e microbicida de monócitos foram avaliadas após 2 e 24 h, respectivamente. Desta maneira, constatamos que o bloqueio da via de sinalização Notch, através do tratamento com o anti-hDLL4, aumenta significativamente a capacidade fagocítica de monócitos em

comparação ao grupo controle (Figura 20A). Sugerindo que a ausência do ligante DLL4 favorece a fagocitose dos Mtb por monócitos no sítio de infecção.

Figura 20. A função fagocítica de monócitos depende da ativação da via Notch. As PBMCs recém-isoladas de indivíduos controle foram pré-tratadas ou não durante 24 horas com anti-hDLL1 e anti-hDLL4 e infectadas em seguida com cepas Mtb H37Rv. A função celular foi avaliada através fagocitose (2 horas) (A) e atividade microbicida (24 horas) (B). As análises desse experimento foram realizadas utilizando ensaio de metabolização de resazurina pelas bactérias vivas. As barras representam a média ± desvio padrão (n=6). Os dados foram analisados através do teste estatístico *t test*. **P*<0,05.

6. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento da TB o modo como as células do sistema imune reagem à infecção define a progressão da doença. Nesse sentido, tanto os mecanismos mediados por células do sistema imune inato, quanto células da imunidade adaptativa são essenciais para a defesa do organismo, envolvendo principalmente macrófagos, células dendríticas e células T [32]. Assim, a produção de citocinas, peptídeos antimicrobianos e quimiocinas favorecem o microambiente inflamatório, recrutamento e ativação de novas células no sítio de infecção, que na maioria das vezes culmina no controle e na erradicação do Mtb [22] [33]. Em adição, a interação celular é fundamental para desencadear diferentes mecanismos imunológicos que são regulados e influenciados por diferentes vias de sinalização, como a via Notch [85].

Muitos grupos de pesquisa têm buscado novos alvos moleculares para terapia e/ou diagnóstico, que levam em consideração as micobactérias e a resposta imune do hospedeiro a fim de melhorar as defesas e o prognóstico da TB, nessa perspectiva, a sinalização Notch tem sido descrita como uma via importante para a manutenção da resposta imunológica durante a infecção por Mtb [9], [10], [11], [12], [14], [15]. Sendo assim, sugerimos a importância de estudar e caracterizar a via Notch no desenvolvimento da doença ativa em humanos. Dessa forma, propusemos estudar células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose ativa, em específico subpopulações de monócitos e células T.

Os monócitos, células mononucleares circulantes, possuem papel central na imunidade, sendo indispensáveis durante o processo de inflamação e controle da Mtb, uma vez que são rapidamente recrutadas para o sítio de infecção, onde se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas. Na literatura, diferentes subtipos de monócitos foram descritos, levando em consideração a expressão de marcador de superfície CD14 e CD16. Geralmente, em indivíduos saudáveis, em média 80-95% dos monócitos circulantes são CD14⁺⁺CD16⁻ (monócitos clássicos), células com maior atividade fagocítica e microbicida. O segundo subtipo compreende os monócitos CD14⁺⁺CD16⁺ (monócitos intermediários) importantes para a produção de citocinas e favorecem as respostas pró-inflamatórias. E por fim, monócitos CD14⁺CD16⁺⁺ (monócitos não-clássicos), os quais apresentam maior atividade anti-inflamatória [86], [87]. Neste trabalho, por meio de citometria de fluxo observamos em PBMCs de pacientes com TB ativa e em cultura de PBMCs infectadas com cepas de Mtb H37Rv, aumento significativo no número de monócitos CD14⁺CD16⁺⁺ quando comparados aos controles corroborando com dados da literatura [86], [88], [89].

A expressão de ligantes Notch, principalmente o DLL1 e DLL4, em monócitos, macrófagos e células dendríticas influencia em diversos mecanismos imunológicos como alterações de respostas pró-inflamatórias, ativação e polarização de células T [14], [67], [70],

[76]. Sendo assim, ao avaliarmos a expressão desses ligantes em subpopulações de monócitos de pacientes com TB ativa observamos aumento significativo na expressão de DLL4 em monócitos $CD14^{++}CD16^{+}$ e $CD14^{+}CD16^{++}$. Ademais, *in vitro* após infecção com cepas de Mtb H37Rv, evidenciamos aumento na expressão de DLL4 em monócitos $CD14^{++}CD16^{+}$, sugerindo que a interação com o Mtb induz especificamente a expressão desse ligante. Surpreendentemente, após análises de correlação, a expressão de DLL4 em monócitos $CD14^{++}CD16^{+}$ se correlaciona positivamente com a lesão pulmonar em pacientes com TB ativa, o que reforça a importância dessa molécula durante o desenvolvimento da TB. Nessa perspectiva, Schaller e colaboradores (2016) ao avaliarem PBMCs de pacientes com TB ativa, constataram maior expressão de DLL4 em monócitos quando comparado aos indivíduos saudáveis e pacientes após 6 meses de tratamento [14]. Em adição, os autores sugerem que DLL4 pode atuar como um possível biomarcador para distinguir indivíduos infectados e não infectados, já que é possível mensurar os níveis de expressão desse ligante no sangue periférico de humanos [14]. Nosso estudo complementa e corrobora esta informação, a partir do momento em que definimos quais os subtipos de monócitos estão mais correlacionados com a expressão do marcador e com a gravidade da doença.

Ainda em relação aos monócitos, marcadores de ativação destas células têm sido descritos como promissores alvos de estudo, podendo atuar como indicador de função celular e progressão de diversos processos patológicos. Na tuberculose, estudo realizado por nosso grupo mostrou que alguns destes fatores circulantes detectados em fluidos biológicos derivados de monócitos, como os mediadores solúveis CD14 e CD163, estão aumentados no plasma de pacientes com TB ativa e dessa forma, foi possível avaliar o estado de ativação dessas células durante processo inflamatório [89]. Neste trabalho, corroborando os dados já demonstrados pelo nosso grupo e outros autores, observamos que os dois marcadores se encontram aumentados no plasma de pacientes com TB ativa, indicando que os monócitos desses pacientes estão mais ativados sistemicamente quando comparados aos indivíduos saudáveis [89], [90], [91].

Além da resposta de monócitos, o perfil de ativação das células T é crucial no desenvolvimento de resposta adequada ao controle da infecção. Assim, no que concerne às células T, a resposta celular de perfil Th1, com predomínio de resposta mediada por IFN- γ , está associada à proteção do hospedeiro durante a infecção por Mtb e o desbalanço dessa resposta pode ser deletéria em indivíduos acometidos pela doença [33], [43]. Além disso, estudos têm evidenciado que células de perfil Th17 desempenham papel importante no contexto da resposta protetora na TB [40], [92]. Nesse sentido, através de análises por

citometria de fluxo, constatamos que pacientes com TB ativa apresentam diminuição significativa de células T CD4⁺ e de células T CD4⁺ e T CD8⁺ que expressam CXCR3, marcador de ativação de células Th1, inferindo que esses pacientes possuem menor resposta sistêmica de perfil Th1 em comparação aos indivíduos controle. Neste sentido, diversos trabalhos mostraram que a diminuição ou ausência de resposta de perfil Th1 proporciona maior suscetibilidade ao desenvolvimento da TB [93], [94]. De maneira oposta ao observado sistemicamente em análises de sangue periférico, durante a infecção *in vitro* com cepas de Mtb H37Rv, observou-se aumento significativo de células T CD4⁺ e T CD8⁺ que expressam CXCR3. Em contra partida, em nosso estudo, não detectamos diferenças quanto à expressão do receptor CCR6 (marcador de ativação de células Th17). Em adição, sugerimos que a baixa frequência de células T CD4⁺ e a redução de células positivas para CXCR3, indicativo de redução do padrão Th1 de resposta no sangue periférico podem ser resultado de intenso processo de recrutamento e migração dessas células para o local da infecção. Isso é corroborado pela evidência de que células T produtoras de IFN- γ e IL-17 expressam CXCR3 e CCR6, respectivamente, o que pode promover o direcionamento dessas células T para os locais de infecção [95]–[97].

Assim como avaliado em monócitos, a via de sinalização Notch também apresenta constituintes expressos nas células T. Os receptores Notch 1 e Notch 2 são expressos constitutivamente em diferentes estágios do ciclo de vida de linfócitos e, dessa forma, a via Notch parece influenciar diretamente no desenvolvimento e na função efetora dessas células [85], [98]. Diferentes trabalhos demonstraram que os receptores Notch 1 e 2 favorecem a função de células Th1 [98]. Neste trabalho, evidenciamos diminuição significativa na intensidade média de fluorescência do receptor Notch 2 em células T CD8⁺ periféricas em pacientes com tuberculose ativa. Entretanto, quando células de indivíduos saudáveis foram infectadas *in vitro* Mtb H37Rv foi observado o aumento do número de células T CD4⁺ que expressão de Notch 2. Até o momento, não existem estudos mostrando a modulação de Notch 2 durante a infecção por Mtb. Estudos têm demonstrado apenas a regulação de Notch 1, como observado em macrófagos peritoneais murinos infectados com *M. bovis* BCG, os autores observaram que essa regula positivamente a expressão de Notch 1 [9], [83], porém em nosso estudo não observamos nenhuma modulação deste receptor durante a infecção por Mtb. Em relação a Notch2, no entanto, já existem trabalhos relacionando a expressão deste receptor e a regulação da função de células T CD8⁺ em outros modelos de doenças. Maekawa e colaboradores (2008) evidenciaram que o domínio intracelular de Notch 2 em células T CD8⁺, interage com o fator de transcrição CREB1, dessa forma, promovem ativação de células T

citotóxicas e regulam diretamente a produção de perforinas e granzima B [99]. Auderset e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão compensatória de Notch 2, na ausência de Notch 1 é importante para promover a diferenciação de células Th1 durante infecção por *L. major* [100].

Uma vez que observamos uma modulação na expressão dos receptores e ligantes na doença ativa, buscamos compreender o papel da regulação desta via na progressão da tuberculose. Assim, análises de correlação mostrando a expressão dos receptores Notch 1 – 2 com a gravidade da TB indicam que a expressão de Notch 1 em células T CD4⁺ se correlaciona positivamente com o grau de lesão pulmonar em pacientes com TB ativa. Apesar de não observarmos diferenças significativas na expressão de Notch 1 quando comparamos pacientes com TB ativa aos indivíduos saudáveis, ao avaliarmos a expressão desse receptor dentro do grupo de pacientes com TB ativa, observamos que os pacientes com grau moderado e avançado de lesão pulmonar são os que mais expressam Notch 1 em células T CD4⁺, reforçando a ideia de que esse receptor está associado à progressão da doença. No que diz respeito à ativação da via, observamos que mais de 50% dos pacientes com tuberculose ativa são altos produtores de HES1 e DTX diferente dos indivíduos controle. Além disso, PBMCs infectadas com *Mtb in vitro*, apresentam maior tendência na expressão de HES1. Dessa maneira, essas observações sugerem que a via Notch pode ser ativada de forma sistêmica e local durante a infecção por *Mtb* e que sua ativação pode ser prejudicial para o desfecho da doença.

Desde a descrição da sinalização Notch por Morgan e colaboradores (1916) tem sido proposto a importância dessa via para diversos mecanismos celulares de organismos metazoários, abordados na introdução desse trabalho [50]. Na hematopoese, por exemplo, a via Notch possui um papel essencial durante o desenvolvimento de células T [85]. Além disso, a ativação da via Notch está diretamente envolvida na regulação de respostas pró-inflamatórias, principalmente no que se diz respeito à diferenciação e função de células T, porém os mecanismos envolvidos ainda são controversos [69]–[72], [85]. A função dos ligantes Notch na diferenciação de células T *helper* foi relatada por Flavell e colaboradores (2004), no qual, foi inferindo que a expressão de diferentes ligantes em células APCs poderiam estar associadas ao desenvolvimento de células Th1 e Th2 [70]. Atualmente, sabe-se que a expressão de ligantes específicos têm influência na diferenciação e função de células T CD4⁺ e que o envolvimento dos ligantes DLL se associam ao desenvolvimento de células Th1 e Th17 [14], [101], [102], [103]. Nesse sentido, Schaller e colaboradores (2016) constataram que o bloqueio de DLL4, utilizando anticorpos específicos (anti-DLL4) reduz à

produção de citocinas IFN- γ e IL-17 por células T, sugerindo que o DLL4 é importante para modular a produção de IFN- γ e IL-17 [14].

Tendo em vista o papel modulador da via Notch nas respostas pró-inflamatórias, avaliamos o perfil de citocinas produzidas por células de pacientes com TB ativa, porém não observamos diferenças significativas na expressão gênica de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-10 e TGF- β em PBMCs desses pacientes. No entanto, evidenciamos através da análise de bioassinatura que no grupo de indivíduos com a doença ativa mais de 50% dos indivíduos são considerados altos produtores de TNF- α , IL-17A, IL-6, TGF- β e IL-10. Ainda ao avaliarmos o perfil de citocinas plasmático de pacientes com TB ativa, observamos diminuição dos níveis de IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-1 β e RANTES quando comparados aos indivíduos controle. Ainda, sugerimos que a diminuição de IFN- γ , IL-17A, IL-4 e IL-2 se associam à diminuição de células T CD4⁺ e RANTES (CCL5), quimiocina importante no processo inflamatório, pois promove a diferenciação de células T e recrutamento dessas células para o sítio de infecção [104], [105]. Contudo, estudo realizado por Zambuzi e colaboradores (2016) mostrou aumento nos níveis de RANTES no plasma de pacientes com TB ativa [90]. A redução não esperada das citocinas pró-inflamatórias nestes pacientes pode ser resultado da regulação dos componentes da via Notch, como já demonstrado por Narayana e colaboradores (2008). Neste sentido, o trabalho citado demonstrou que o aumento na expressão de Supressor de Sinalização de Citocinas 3 (SOCS3), regula negativamente diversas citocinas e está associado com regulação positiva na expressão de Notch 1 em macrófagos peritoneais de camundongos infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG, sugerindo que Notch 1 possui papel na modulação de respostas inflamatórias durante infecção por Mtb [9]. Porém, no presente trabalho não avaliamos a expressão de SOCS3 e a sua relação com a via Notch em nossa coorte de pacientes.

Diversos trabalhos descreveram que citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-17, IL-1 β e IL-6) podem promover resposta protetora na TB. Em especial, o IFN- γ , produzido por células Th1 é essencial durante resposta imune contra Mtb, pois estimula macrófagos favorecendo a atividade microbicida através de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio [106], [107]. Nosso grupo mostrou que níveis plasmáticos dessa citocina se mantiveram inalterados em pacientes com TB ativa [90]. A IL-17, produzida por células Th17, é importante na resposta contra Mtb, pois tem a capacidade de influenciar diversas células, como neutrófilos, favorecendo a formação de granulomas [92]. Além disso, o papel protetor de citocinas de perfil Th17, ainda é questionado, pois em doenças crônicas a resposta pode ser prejudicial e favorecer a progressão da doença [108]. Em concordância com nossos resultados, Chen e

colaboradores (2010) mostraram diminuição na resposta Th17 em pacientes com TB [96]. No que concerne a IL-1 β , uma citocina induzida na resposta inflamatória e liberada por células da imunidade inata. Estudos caracterizaram sua importância durante resposta protetora contra Mtb [109]. Entretanto, Zambuzi e colaboradores (2016) não observaram diferenças de IL-1 β e IL-17 no plasma de pacientes com tuberculose ativa [90].

A citocina IL-6 é considerada importante para a regulação da resposta inflamatória, mas na TB sua função ainda é duvidosa [110], [111]. Essa citocina é produzida por muitas células do sistema imune e estimula outras células a produzirem IFN- γ induzindo resposta protetora [112], [110]. Por outro lado, níveis elevados de IL-6 foram relacionados ao desenvolvimento da TB ativa [113], [114]. Observamos aumento significativo nos níveis de IL-6 e IP-10 (CXCL10) em pacientes com TB ativa. Esses resultados confirmam dados anteriores publicados por nosso grupo, em que detectaram níveis elevados de IL-6 no plasma de pacientes com TB ativa e detecção simultânea de IL-6 e CD14s, podem ser biomarcadores para identificar pacientes com TB ativa [90]. Em adição, Singh e colaborador (2013) sugerem que IL-6 pode ser utilizada como biomarcador durante infecção causada por micobactérias [115]. A quimiocina IP-10, produzida por células APCs infectadas ou por estímulo de IFN- γ , IL-17 [116], desempenha papel importante na infecção na TB, pois auxilia o recrutamento de células para o sítio de infecção favorecendo o microambiente inflamatório [117]. Ao estimular células de sangue periférico de paciente com tuberculose com antígenos de Mtb, Ruhwald e colaboradores (2007) evidenciaram altos níveis de IP-10, diferente do observado em indivíduos controle [116], [118]. Além disso, Azzurri e colaboradores (2005) detectaram níveis elevados de IP-10 no sangue de pacientes com TB [117]. Essa quimiocina é considerada um possível biomarcador para diagnóstico de pacientes com tuberculose [116].

Apesar de não observamos diferenças na quantificação plasmática para a maioria destas citocinas, demonstramos que os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-12, IL-1 β , RANTES e IL-10 se correlacionam com maior grau de lesão pulmonar e os níveis plasmáticos de IL-17A se correlacionam positivamente com expressão de DLL4 em monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ e CD14⁺⁺CD16⁺. Além disso, níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-2, e IL-1 β se correlacionam positivamente com a expressão de Notch 1 em células T CD4⁺. Tais dados nos permitem sugerir uma associação entre a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro com a expressão dos componentes da via de sinalização Notch, bem como sua relação com a progressão da doença, o que demonstra mais uma vez a importância da via na tuberculose humana. Em adição, os níveis de CD163s, IP-10 e procalcitonina se correlacionam com a expressão de Notch 1 em células T CD8⁺. Estudos já evidenciaram o

papel negativo de alguns desses mediadores na TB, por exemplo, a produção de IFN- γ e IL-17 por células T CD4⁺ de pacientes com tuberculose ativa estimuladas *in vitro* com Mtb, foram associados com a gravidade da doença [108]. Em adição, Rook e colaboradores (2004) relacionaram IL-4 com patogênese da TB, já que essa citocina tem capacidade de influenciar negativamente a ativação de macrófagos, síntese de óxido nítrico e expressão de TLR 2, importante para reconhecimento da Mtb [119]. Além disso, IL-4 tem papel na reativação da doença ativa em pacientes com TB latente [120]. Zambuzi e colaboradores (2016) evidenciaram aumento significativo dos níveis de CD163s em pacientes com TB ativa e sugerem que CD163s seja utilizado como biomarcador para avaliar a progressão da doença [90]. Outro mediador avaliado foi a procalcitonina. Este é um parâmetro clínico, obtido no prontuário dos pacientes e é utilizado na rotina clínica como marcador laboratorial de septicemia e de infecções pulmonares agudas. Rasmussen e colaboradores (2011) demonstraram que os níveis séricos de procalcitonina aumentam significativamente com o avanço da TB, ademais, a avaliação dos níveis desse marcador pode prever o risco de mortalidade [121]. De acordo, com as informações apresentadas temos mais indícios de que a expressão de DLL4 em subpopulações de monócitos e Notch 1 em células T refletem a progressão da TB.

Ao avaliarmos os efeitos do contato direto das micobactérias com as células mononucleares *in vitro*, verificamos que os receptores Notch têm importante função na modulação de respostas pró-inflamatórias. Observamos que no sobrenadante das culturas de PBMCs infectadas com Mtb H37Rv e tratadas com GSI, houve diminuição da produção de IL-17A, IL-2 e IL-10 corroborando com trabalhos já publicados. Em 2009, Mukherjee e colaboradores, mostraram em experimentos *in vitro* com células T CD4⁺ de murinos, que a produção de IL-17 é dependente da ativação Notch mediada por DLL4, além disso, os autores mostraram que o complexo transcricional ativo de Notch tem a capacidade de se ligar diretamente em promotores do gene Rorc e IL-17, e assim, modular a ativação desses genes [103]. A expressão aumentada da porção intracelular de Notch pode induzir aumento na produção de IL-2 e a expressão da subunidade α do receptor de IL-2 em células T [122]. Também foi mostrado que a ativação da via Notch induz a produção de IL-10 por células que antes apresentavam perfil Th1, e esta modulação foi dependente de STAT4, onde células Th1 pró-inflamatórias foram polarizadas para perfil de células T com atividade reguladora. Esse mecanismo pode ser ativado pela interação de qualquer um dos receptores Notch expressos em células T e por DLL4 expresso em DC. Além disso, o efeito é revertido quando utilizado GSI [123]. Em relação à IL-8, observamos aumento significativo quando as células foram

tratadas com GSI, diferente do relatado por Liu e colaboradores (2016), em que observaram regulação negativa de Notch 1 relacionado a inativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), o que inibiu a expressão de genes alvo, como IL-8 [124].

Ainda, ao adicionarmos proteína recombinante DLL1r nas culturas de PBMCs, detectamos aumento significativo de IL-1 β e diminuição de IP-10. Alguns estudos indicam que a via Notch pode influenciar e cooperar com outras vias de sinalização, como a de NF- κ B [124], [125], [85]. A via de NF- κ B é essencial para induzir expressão de genes de várias citocinas importantes para a resposta inflamatória, como IL-1 β [126]. Dessa forma, a ativação da via Notch dependente de DLL1 pode influenciar a via de NF- κ B favorecendo a produção de IL-1 β ou o complexo transcricionalmente ativo de Notch, pode estar regulando diretamente a expressão desta citocina. No entanto, se fazem necessários outros estudos a fim de avaliar esses mecanismos. No que concerne a IP-10, Pérez-Cabezas (2011) constataram que a inibição da via Notch em células DCs plasmocitóides diminui a produção dessa quimiocina [127].

Ao bloquearmos DLL4 com anticorpo anti-hDLL4 observamos aumento de TNF- α . Nessa perspectiva, constatamos que o bloqueio de DLL4 melhora a atividade fagocítica de monócitos durante infecção por Mtb. Entretanto, não observamos diferenças na atividade microbicida dessas células devido ao curto tempo de incubação das culturas de PBMCs, 24 horas, tempo esse, insuficiente para montagem de resposta de células T, o que pode influenciar diretamente nos mecanismos funcionais de monócitos. Sabe-se que TNF- α , citocina importante na infecção por Mtb, contribui na ativação de macrófagos, recruta novas células para o sítio de infecção e favorece a formação de granulomas [128]. No que diz respeito a outras patologias, estudos recentes têm apresentado resultados interessantes relacionados que o bloqueio de DLL4. O tratamento de camundongos diabéticos não obesos com anti-DLL4 impede o desenvolvimento de diabetes do tipo 1, promovendo aumento de células Tregs naturais [129]. Em outro estudo, quando há o bloqueio de DLL4 durante o desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE) favorece aumento de células Tregs e diminui a gravidade da doença [130]. Embora, outros estudos tenham mostrado que em modelos de infecção por Mtb, a neutralização de DLL4 promove diminuição de IL-17 [10], [14]. Em nosso estudo, não observamos diferenças na produção de IL-17A, quando pré-tratamos as células com anti-hDLL4 e DLL4r e não há influência na produção de IFN- γ , IL-4, IL-12, IL-6 e RANTES.

Por fim, com o conjunto de dados aqui discutidos e como apresentado de forma sucinta na Figura 21, sugerimos que: i) a sinalização Notch é modulada durante a infecção por

Mtb; ii) a expressão de DLL4 em monócitos intermediários apresentam relação com gravidade da TB; iii) a expressão de Notch 1 em células T CD4⁺ apresentam relação com gravidade da TB; iv) a infecção modula a ativação da via Notch; v) a via Notch modula a produção de citocinas; vi) o bloqueio do ligante DLL4 favorece a atividade de monócitos; e vii) DLL4 e Notch 1 são potenciais biomarcadores de progressão da doença.

Figura 21. Esquema final dos resultados encontrados neste trabalho. A sinalização Notch é modulada de forma sistêmica e local (sítio de infecção) durante a infecção por Mtb. Citocinas pró- e anti-inflamatórias se encontram alteradas em pacientes com TB ativa e a expressão do receptor Notch 1 e do ligante DLL4 são importantes para esse processo de modulação das respostas mediadas por citocinas. A expressão de Notch 1 (células T CD4⁺) e DLL4 (CD14⁺CD16⁻) foram associados a maior gravidade da TB. Sendo assim, o conjunto de dados deste trabalho indicam que o ligante DLL4 e o receptor Notch 1 são potenciais biomarcadores para avaliar a progressão da TB em humanos. (↔) correlação positiva; (↑) aumento (↓) redução na expressão/produção.

7. CONCLUSÕES

A infecção por Mtb ativa a via de sinalização Notch, a qual se demonstra prejudicial para o hospedeiro por modular respostas pró- e anti-inflamatórias, como IL-17, TNF- α e IL-10. A via Notch também regula os mecanismos funcionais de monócitos, importantes para o controle da infecção. Além disso, o aumento da expressão de Notch 1 (em células T) e de DLL4 (em monócitos intermediários) estão relacionados a formas graves da doença. Assim, em conjunto, esses constituintes da via são potenciais biomarcadores relacionados à progressão da doença.

8. REFERÊNCIAS

De acordo com: IEEE

Autor: Michael Berkowitz , 17 de dezembro de 2013

- [1] World Health Organization (WHO), “Tuberculosis (TB),” 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/tb/en/>.
- [2] I. Barberis, N. L. Bragazzi, L. Galluzzo, and M. Martini, “The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch’s bacillus,” *J. Prev. Med. Hyg.*, vol. 58, no. 1, pp. E9–E12, 2017.
- [3] C. Gradmann, “Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin,” *Med. Hist.*, vol. 45, no. 1, pp. 1–32, 2001.
- [4] C. Dye, S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, and M. C. Raviglione, “Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project,” *Jama*, vol. 282, no. 7, pp. 677–86, 1999.
- [5] E. Vynnycky and P. E. M. Fine, “Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 152, no. 3, pp. 247–263, 2000.
- [6] D. B. Young, M. D. Perkins, K. Duncan, and C. E. Barry, “Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 4, pp. 1255–1265, 2008.
- [7] E. L. Corbett, C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione, and C. Dye, “The growing burden of tuberculosis: Global trends and interactions with the HIV epidemic,” *Archives of Internal Medicine*, vol. 163, no. 9, pp. 1009–1021, 2003.
- [8] J. P. Millet, A. Moreno, L. Fina, L. Del Baño, A. Orcau, P. G. De Olalla, and J. A. Caylà, “Factors that influence current tuberculosis epidemiology,” *Eur. Spine J.*, vol. 22, no. SUPPL.4, 2013.
- [9] Y. Narayana and K. N. Balaji, “NOTCH1 up-regulation and signaling involved in *Mycobacterium bovis* BCG-induced SOCS3 expression in macrophages,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 18, pp. 12501–12511, 2008.
- [10] T. Ito, M. Schaller, C. M. Hogaboam, T. J. Standiford, M. Sandor, N. W. Lukacs, S. W. Chensue, and S. L. Kunkel, “TLR9 regulates the mycobacteria-elicited pulmonary granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4,” *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 1, pp. 33–46, 2009.
- [11] T. Palaga, S. Ratanabunyong, T. Pattarakankul, N. Sangphech, W. Wongchana, Y. Hadae, and P. Kueanjinda, “Notch signaling regulates expression of Mcl-1 and apoptosis in PPD-treated macrophages,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 10, no. 5, pp. 444–452, 2013.
- [12] N. Kapoor, Y. Narayana, S. a Patil, and K. N. Balaji, “Nitric oxide is involved in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin-activated Jagged1 and Notch1 signaling,” *J. Immunol.*, vol. 184, no. 8, pp. 3117–3126, 2010.
- [13] S. Holla, E. Stephen-Victor, P. Prakhar, M. Sharma, C. Saha, V. Udupa, S. V. Kaveri, J. Bayry, and K. N. Balaji, “Mycobacteria-responsive sonic hedgehog signaling mediates programmed death-ligand 1- and prostaglandin E2-induced regulatory T cell expansion,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 24193, 2016.
- [14] M. A. Schaller, R. M. Allen, S. Kimura, C. L. Day, and S. L. Kunkel, “Systemic expression of Notch Ligand delta-like 4 during mycobacterial infection alters the T Cell immune response,” *Front. Immunol.*, vol. 7, no. NOV, pp. 1–11, 2016.
- [15] Q. Li, H. Zhang, L. Yu, C. Wu, X. Luo, H. Sun, and J. Ding, “down-regulation of Notch signaling pathway reverses the Th1/th2 imbalance in tuberculosis patients,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 54, pp. 24–32, 2018.
- [16] M. G. Harisinghani, T. C. McCloud, J.-A. O. Shepard, J. P. Ko, M. M. Shroff, and P. R. Mueller, “Tuberculosis from Head to Toe,” *RadioGraphics*, vol. 20, no. 2, pp. 449–470, 2000.
- [17] S. H. E. Kaufmann, “How can immunology contribute to the control of tuberculosis?,”

- Nat. Rev. Immunol.*, vol. 1, no. 1, p. 20, 2001.
- [18] K. P. Fennelly, E. C. Jones-López, I. Ayakaka, S. Kim, H. Menyha, B. Kirenga, C. Muchwa, M. Joloba, S. Dryden-Peterson, and N. Reilly, “Variability of infectious aerosols produced during coughing by patients with pulmonary tuberculosis,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 186, no. 5, pp. 450–457, 2012.
 - [19] E.-K. Jo, “Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs,” *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 21, no. 3, pp. 279–286, 2008.
 - [20] J. Kleinnijenhuis, M. Oosting, L. A. B. Joosten, M. G. Netea, and R. Van Crevel, “Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*,” *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2011, 2011.
 - [21] C. V Harding and W. H. Boom, “Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 4, p. 296, 2010.
 - [22] J. Castañeda-Delgado, R. Hernández-Pando, C. J. Serrano, D. Aguilar-León, J. León-Contreras, C. Rivas-Santiago, R. Mendez, I. González-Curiel, A. Enciso-Moreno, and B. Rivas-Santiago, “Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 161, no. 3, pp. 542–550, 2010.
 - [23] L. S. Schlesinger, “Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes,” in *Tuberculosis*, Springer, 1996, pp. 71–96.
 - [24] V. Ramos-Kichik, R. Mondragón-Flores, M. Mondragón-Castelán, S. Gonzalez-Pozos, S. Muñoz-Hernandez, O. Rojas-Espinosa, R. Chacón-Salinas, S. Estrada-Parra, and I. Estrada-García, “Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*,” *Tuberculosis*, vol. 89, no. 1, pp. 29–37, 2009.
 - [25] P.-J. Cardona, “The progress of therapeutic vaccination with regard to tuberculosis,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 1536, 2016.
 - [26] I. V Lyadova, “Neutrophils in tuberculosis: heterogeneity shapes the way?,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2017, 2017.
 - [27] J. L. Gansert, V. Kießler, M. Engele, F. Wittke, M. Röllinghoff, A. M. Krensky, S. A. Porcelli, R. L. Modlin, and S. Stenger, “Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 6, pp. 3154–3161, 2003.
 - [28] M. Kulpraneet, S. Sukwit, K. Sumransurp, T. Chuenchitra, S. Santiwatanakul, and S. Srisurapanon, “Cytokine production in NK and NKT cells from *Mycobacterium tuberculosis* infected patients,” 2007.
 - [29] R. Zhang, X. Zheng, B. Li, H. Wei, and Z. Tian, “Human NK cells positively regulate $\gamma\delta$ T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis*,” *J. Immunol.*, vol. 176, no. 4, pp. 2610–2616, 2006.
 - [30] S. Ehrt and D. Schnappinger, “Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses,” *Cell. Microbiol.*, vol. 11, no. 8, pp. 1170–1178, 2009.
 - [31] M. Harrieff, G. Purdy, and D. M. Lewinsohn, “Escape from the phagosome: the explanation for MHC-I processing of mycobacterial antigens?,” *Front. Immunol.*, vol. 3, p. 40, 2012.
 - [32] S. M. Behar, C. J. Martin, M. G. Booty, T. Nishimura, X. Zhao, H. X. Gan, M. Divangahi, and H. G. Remold, “Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*,” *Mucosal Immunol.*, vol. 4, no. 3, p. 279, 2011.
 - [33] J. L. Flynn and J. Chan, “Immunology of tuberculosis,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 19, no. 1, pp. 93–129, 2001.
 - [34] A. M. Cooper, “Cell-mediated immune responses in tuberculosis,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 393–422, 2009.

- [35] L. L. Roberts and C. M. Robinson, “*Mycobacterium tuberculosis* infection of human dendritic cells decreases integrin expression, adhesion and migration to chemokines,” *Immunology*, vol. 141, no. 1, pp. 39–51, 2014.
- [36] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, “Helper T cells and lymphocyte activation,” 2002.
- [37] N. D. Pennock, J. T. White, E. W. Cross, E. E. Cheney, B. A. Tamburini, and R. M. Kedl, “T cell responses: naive to memory and everything in between,” *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 37, no. 4, pp. 273–283, 2013.
- [38] M. U. Shiloh and C. F. Nathan, “Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of *Salmonella* and mycobacteria,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 35–42, 2000.
- [39] S. A. Khader, G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, and S. L. Swain, “IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge,” *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 4, p. 369, 2007.
- [40] E. Torrado and A. M. Cooper, “IL-17 and Th17 cells in tuberculosis,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 21, no. 6, pp. 455–462, 2010.
- [41] E. Lockhart, A. M. Green, and J. L. Flynn, “IL-17 production is dominated by $\gamma\delta$ T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 7, pp. 4662–4669, 2006.
- [42] M. Umemura, A. Yahagi, S. Hamada, M. D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, T. Suda, K. Sudo, S. Nakae, and Y. Iwakura, “IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 6, pp. 3786–3796, 2007.
- [43] C. Lienhardt, A. Azzurri, A. Amedei, K. Fielding, J. Sillah, O. Y. Sow, B. Bah, M. Benagiano, A. Diallo, and R. Manetti, “Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 32, no. 6, pp. 1605–1613, 2002.
- [44] Z. T. Handzel, V. Barak, Y. Altman, H. Bibi, M. Lidgi, M. Iancovici-Kidon, D. Yassky, and M. Raz, “Increased Th1 and Th2 type cytokine production patients with active tuberculosis,” *IMAJ-RAMAT GAN-*, vol. 9, no. 6, p. 479, 2007.
- [45] L. D. Jasenosky, T. J. Scriba, W. A. Hanekom, and A. E. Goldfeld, “T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans,” *Immunol. Rev.*, vol. 264, no. 1, pp. 74–87, 2015.
- [46] V. Lazarevic and J. Flynn, “CD8⁺ T cells in tuberculosis,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 166, no. 8, pp. 1116–1121, 2002.
- [47] D. Sud, C. Bigbee, J. L. Flynn, and D. E. Kirschner, “Contribution of CD8⁺ T cells to control of *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *J. Immunol.*, vol. 176, no. 7, pp. 4296–4314, 2006.
- [48] P. L. Lin and J. L. Flynn, “CD8 T cells and *Mycobacterium tuberculosis* infection,” in *Seminars in immunopathology*, 2015, vol. 37, no. 3, pp. 239–249.
- [49] D. B. Young, M. D. Perkins, K. Duncan, and C. E. Barry, “Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 4, pp. 1255–1265, 2008.
- [50] T. H. Morgan and C. B. Bridges, *Sex-linked inheritance in Drosophila*, no. 237. Carnegie institution of Washington, 1916.
- [51] J. S. Mumm and R. Kopan, “Notch signaling: from the outside in,” *Dev. Biol.*, vol. 228, no. 2, pp. 151–165, 2000.
- [52] K. G. Leong and A. Karsan, “Recent insights into the role of Notch signaling in

- tumorigenesis,” *Blood*, vol. 107, no. 6, pp. 2223–2233, 2006.
- [53] E. Gazave, P. Lapébie, G. S. Richards, F. Brunet, A. V Ereskovsky, B. M. Degnan, C. Borchellini, M. Vervoort, and E. Renard, “Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes,” *BMC Evol. Biol.*, vol. 9, no. 1, p. 249, 2009.
- [54] K. Fitzgerald, H. A. Wilkinson, and I. Greenwald, “glp-1 can substitute for lin-12 in specifying cell fate decisions in *Caenorhabditis elegans*,” *Development*, vol. 119, no. 4, pp. 1019–1027, 1993.
- [55] R. Kopan and M. X. G. Ilagan, “The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism,” *Cell*, vol. 137, no. 4, pp. 216–233, 2009.
- [56] S. J. Bray, “Notch signalling: a simple pathway becomes complex,” *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 7, no. 9, p. 678, 2006.
- [57] J. F. de Celis and S. J. Bray, “The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe,” *Development*, vol. 127, no. 6, pp. 1291–1302, 2000.
- [58] J. Cordle, C. RedfieldZ, M. Stacey, P. A. van der Merwe, A. C. Willis, B. R. Champion, S. Hambleton, and P. A. Handford, “Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 17, pp. 11785–11793, 2008.
- [59] A. Raya, Y. Kawakami, C. Rodríguez-Esteban, M. Ibañes, D. Rasskin-Gutman, J. Rodríguez-León, D. Büscher, J. A. Feijó, and J. C. I. Belmonte, “Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left–right determination,” *Nature*, vol. 427, no. 6970, p. 121, 2004.
- [60] M. J. Malecki, C. Sanchez-Irizarry, J. L. Mitchell, G. Histen, M. L. Xu, J. C. Aster, and S. C. Blacklow, “Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 12, pp. 4642–4651, 2006.
- [61] A. Pintar, A. De Biasio, M. Popovic, N. Ivanova, and S. Pongor, “The intracellular region of Notch ligands: Does the tail make the difference?,” *Biol. Direct*, vol. 2, pp. 1–13, 2007.
- [62] C. R. Chillakuri, D. Sheppard, S. M. Lea, and P. A. Handford, “Notch receptor–ligand binding and activation: Insights from molecular studies,” in *Seminars in cell & developmental biology*, 2012, vol. 23, no. 4, pp. 421–428.
- [63] E. Gazave, A. Guillou, and G. Balavoine, “History of a prolific family: the Hes/Hey-related genes of the annelid *Platynereis*,” *Evodevo*, vol. 5, no. 1, p. 29, 2014.
- [64] M. Katoh and M. Katoh, “Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer,” *Int. J. Oncol.*, vol. 31, no. 2, pp. 461–466, 2007.
- [65] T. Palaga, C. Buranaruk, S. Rengpipat, A. H. Fauq, T. E. Golde, S. H. E. Kaufmann, and B. A. Osborne, “Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 1, pp. 174–183, 2008.
- [66] J. Foldi, A. Y. Chung, H. Xu, J. Zhu, H. H. Outtz, J. Kitajewski, Y. Li, X. Hu, and L. B. Ivashkiv, “Autoamplification of Notch signaling in macrophages by TLR-induced and RBP-J-dependent induction of Jagged1,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 9, pp. 5023–5031, 2010.
- [67] E. Fung, S.-M. T. Tang, J. P. Canner, K. Morishige, J. F. Arboleda-Velasquez, A. A. Cardoso, N. Carlesso, J. C. Aster, and M. Aikawa, “Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation,” *Circulation*, vol. 115, no. 23, pp. 2948–2956, 2007.

- [68] Y. Shang, S. Smith, and X. Hu, "Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease," *Protein Cell*, vol. 7, no. 3, pp. 159–174, 2016.
- [69] D. Amsen, A. Antov, D. Jankovic, A. Sher, F. Radtke, A. Souabni, M. Busslinger, B. McCright, T. Gridley, and R. A. Flavell, "Direct Regulation of Gata3 Expression Determines the T Helper Differentiation Potential of Notch," *Immunity*, vol. 27, no. 1, pp. 89–99, 2007.
- [70] D. Amsen, J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, and R. A. Flavell, "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells," *Cell*, vol. 117, no. 4, pp. 515–526, 2004.
- [71] Y. Maekawa, C. Ishifune, S. Tsukumo, K. Hozumi, H. Yagita, and K. Yasutomo, "Notch controls the survival of memory CD4⁺ T cells by regulating glucose uptake," *Nat. Med.*, vol. 21, no. 1, p. 55, 2015.
- [72] I. Maillard, T. Fang, and W. S. Pear, "Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 945–974, 2005.
- [73] P. Cheng and D. Gabrilovich, "Notch signaling in differentiation and function of dendritic cells," *Immunol. Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–14, 2008.
- [74] A. Koyanagi, C. Sekine, and H. Yagita, "Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 418, no. 4, pp. 799–805, 2012.
- [75] T. Ito, J. M. Connett, S. L. Kunkel, and A. Matsukawa, "Notch system in the linkage of innate and adaptive immunity," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 92, no. 1, pp. 59–65, 2012.
- [76] E. Yamaguchi, S. Chiba, K. Kumano, A. Kunisato, T. Takahashi, T. Takahashi, and H. Hirai, "Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice," *Immunol. Lett.*, vol. 81, no. 1, pp. 59–64, 2002.
- [77] P. Rizzo, C. Osipo, K. Foreman, T. Golde, B. Osborne, and L. Miele, "Rational targeting of Notch signaling in cancer," *Oncogene*, vol. 27, no. 38, p. 5124, 2008.
- [78] X. Yuan, H. Wu, H. Xu, H. Xiong, Q. Chu, S. Yu, G. S. Wu, and K. Wu, "Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment," *Cancer Lett.*, vol. 369, no. 1, pp. 20–27, 2015.
- [79] D. Bellavia, R. Palermo, M. P. Felli, I. Screpanti, and S. Checquolo, "Notch signaling as a therapeutic target for Acute Lymphoblastic Leukemia," *Expert Opin. Ther. Targets*, no. just-accepted, 2018.
- [80] L. Marquez-Exposito, E. Cantero-Navarro, C. Lavoiz, M. Fierro-Fernández, J. Poveda, S. Rayego-Mateos, R. R. Rodrigues-Diez, J. L. Morgado-Pascual, M. Orejudo, and S. Mezzano, "Could Notch signaling pathway be a potential therapeutic option in renal diseases?," *Nefrol. Publ. Of. la Soc. Esp. Nefrol.*, 2018.
- [81] H. Yasukawa, M. Ohishi, H. Mori, M. Murakami, T. Chinen, D. Aki, T. Hanada, K. Takeda, S. Akira, and M. Hoshijima, "IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 6, p. 551, 2003.
- [82] C. Manca, L. Tsenova, S. Freeman, A. K. Barczak, M. Tovey, P. J. Murray, C. Barry III, and G. Kaplan, "Hypervirulent M. tuberculosis W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 25, no. 11, pp. 694–701, 2005.
- [83] K. Bansal, Y. Narayana, S. A. Patil, and K. N. Balaji, "*M. bovis* BCG induced expression of COX-2 involves nitric oxide-dependent and -independent signaling pathways," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 85, no. 5, pp. 804–816, 2009.
- [84] O. Abakay, A. Abakay, H. S. Sen, and A. C. Tanrikulu, "The relationship between inflammatory marker levels and pulmonary tuberculosis severity," *Inflammation*, vol. 38, no. 2, pp. 691–696, 2015.

- [85] F. Radtke, N. Fasnacht, and H. R. MacDonald, “Notch signaling in the immune system,” *Immunity*, vol. 32, no. 1, pp. 14–27, 2010.
- [86] J. Yang, L. Zhang, C. Yu, X.-F. Yang, and H. Wang, “Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases,” *Biomark. Res.*, vol. 2, no. 1, p. 1, 2014.
- [87] L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. M. Leenen, Y.-J. Liu, G. MacPherson, and G. J. Randolph, “Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood,” *Blood*, vol. 116, no. 16, pp. e74–e80, 2010.
- [88] D. Castaño, L. F. García, and M. Rojas, “Increased frequency and cell death of CD16⁺ monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *Tuberculosis*, vol. 91, no. 5, pp. 348–360, 2011.
- [89] C. Lastrucci, A. Bénard, L. Balboa, K. Pingris, S. Souriant, R. Poincloux, T. Al Saati, V. Rasolofo, P. González-Montaner, and S. Inwentarz, “Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16⁺ monocyte population via the IL-10/STAT3 axis,” *Cell Res.*, vol. 25, no. 12, p. 1333, 2015.
- [90] F. A. Zambuzi, P. M. Cardoso-Silva, M. S. Espindola, L. S. Soares, L. J. Galvão-Lima, V. S. Brauer, M. S. Gomes, L. R. Amaral, M. Schaller, and V. R. Bollela, “Identification of promising plasma immune biomarkers to differentiate active pulmonary tuberculosis,” *Cytokine*, vol. 88, pp. 99–107, 2016.
- [91] Y. Suzuki, M. Shirai, K. Asada, S. Miwa, M. Karayama, Y. Nakamura, N. Inui, T. Shirai, H. Hayakawa, and S. Baba, “Utility of Macrophage-activated Marker CD163 for Diagnosis and Prognosis in Pulmonary Tuberculosis,” *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 14, no. 1, pp. 57–64, 2017.
- [92] A. M. Cooper, “Be careful what you ask for: is the presence of IL-17 indicative of immunity?,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 88, no. 2, pp. 221–223, 2010.
- [93] J.-L. Casanova and L. Abel, “Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 1, pp. 581–620, 2002.
- [94] I. V Lyadova and A. V Panteleev, “Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015.
- [95] J. Walrath, L. Zukowski, A. Krywiak, and R. F. Silver, “Resident Th1-like effector memory cells in pulmonary recall responses to *Mycobacterium tuberculosis*,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 33, no. 1, pp. 48–55, 2005.
- [96] X. Chen, M. Zhang, M. Liao, M. W. Graner, C. Wu, Q. Yang, H. Liu, and B. Zhou, “Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4⁺ T Cells,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 181, no. 7, pp. 734–742, 2010.
- [97] J. R. Groom and A. D. Luster, “CXCR3 in T cell function,” *Exp. Cell Res.*, vol. 317, no. 5, pp. 620–631, 2011.
- [98] F. Radtke, H. R. MacDonald, and F. Tacchini-Cottier, “Regulation of innate and adaptive immunity by Notch,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 6, p. 427, 2013.
- [99] Y. Maekawa, Y. Minato, C. Ishifune, T. Kurihara, A. Kitamura, H. Kojima, H. Yagita, M. Sakata-Yanagimoto, T. Saito, and I. Taniuchi, “Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity,” *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 10, p. 1140, 2008.
- [100] F. Auderset, S. Schuster, M. Coutaz, U. Koch, F. Desgranges, E. Merck, H. R. MacDonald, F. Radtke, and F. Tacchini-Cottier, “Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN γ secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*,” *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 3, p. e1002560, 2012.
- [101] K. Mochizuki, S. He, and Y. Zhang, “Notch and inflammatory T-cell response: new developments and challenges,” *Immunotherapy*, vol. 3, no. 11, pp. 1353–1366, 2011.
- [102] J. Sun, C. J. Krawczyk, and E. J. Pearce, “Suppression of Th2 cell development by

- Notch ligands Delta1 and Delta4,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 3, pp. 1655–1661, 2008.
- [103] S. Mukherjee, M. A. Schaller, R. Neupane, S. L. Kunkel, and N. W. Lukacs, “Regulation of T cell activation by Notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and Rorc activation,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 12, pp. 7381–7388, 2009.
- [104] C. M. Matter and C. Handschin, “RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), inflammation, obesity, and the metabolic syndrome.” *Am Heart Assoc*, 2007.
- [105] A. Crawford, J. M. Angelosanto, K. L. Nadwodny, S. D. Blackburn, and E. J. Wherry, “A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection,” *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 7, p. e1002098, 2011.
- [106] J. L. Flynn, J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, and B. R. Bloom, “An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *J. Exp. Med.*, vol. 178, no. 6, pp. 2249–2254, 1993.
- [107] A. M. Green, R. DiFazio, and J. L. Flynn, “IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *J. Immunol.*, p. 1200061, 2012.
- [108] J. O. Jurado, V. Pasquinelli, I. B. Alvarez, D. Peña, A. I. Rovetta, N. L. Tateosian, H. E. Romeo, R. M. Musella, D. Palmero, and H. E. Chuluyán, “IL-17 and IFN- γ expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 91, no. 6, pp. 991–1002, 2012.
- [109] J. Kleinnijenhuis, L. A. B. Joosten, F. L. van de Veerdonk, N. Savage, R. van Crevel, B. J. Kullberg, A. van der Ven, T. H. M. Ottenhoff, C. A. Dinarello, and J. W. M. van der Meer, “Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 β production by *Mycobacterium tuberculosis*,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 7, pp. 1914–1922, 2009.
- [110] T. B. Romero-Adrian, J. Leal-Montie, G. Fernández, and A. Valecillo, “Role of cytokines and other factors involved in the *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *World J. Immunol*, vol. 5, no. 1, pp. 16–50, 2015.
- [111] R. Domingo-Gonzalez, O. Prince, A. Cooper, and S. Khader, “Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 5, 2016.
- [112] O. Dienz and M. Rincon, “The effects of IL-6 on CD4 T cell responses,” *Clin. Immunol.*, vol. 130, no. 1, pp. 27–33, 2009.
- [113] O. El-Ahmady, M. Mansour, H. Zoeir, and O. Mansour, “Elevated concentrations of interleukins and leukotriene in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 34, no. 2, pp. 160–164, 1997.
- [114] F. H. A. Lopes, L. C. de Assis, R. da J. Pires Neto, K. P. Botelho, K. M. Sá, C. C. Frota, J. W. Correia, and M. V. C. Freitas, “Serum levels of interleukin-6 in contacts of active pulmonary tuberculosis,” *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 49, no. 6, pp. 410–414, 2013.
- [115] P. P. Singh and A. Goyal, “Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial infection,” *Springerplus*, vol. 2, p. 686, 2013.
- [116] M. Ruhwald, M. G. Aabye, and P. Ravn, “IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions,” *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 12, no. 2, pp. 175–187, 2012.
- [117] A. Azzurri, O. Y. Sow, A. Amedei, B. Bah, S. Diallo, G. Peri, M. Benagiano, M. M. D’Elios, A. Mantovani, and G. Del Prete, “IFN- γ -inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection,” *Microbes Infect.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2005.
- [118] M. Ruhwald, M. Bjerregaard-Andersen, P. Rabna, K. Kofoed, J. Eugen-Olsen, and P.

- Ravn, "CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7. 7," *Microbes Infect.*, vol. 9, no. 7, pp. 806–812, 2007.
- [119] G. A. W. Rook, R. Hernandez-Pando, K. Dheda, and G. T. Seah, "IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design," *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 9, pp. 483–488, 2004.
- [120] A. Nolan, E. Fajardo, M. L. Huie, R. Condos, A. Pooran, R. Dawson, K. Dheda, E. Bateman, W. N. Rom, and M. D. Weiden, "Increased production of IL-4 and IL-12p40 from bronchoalveolar lavage cells are biomarkers of *Mycobacterium tuberculosis* in the sputum," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e59461, 2013.
- [121] T. A. Rasmussen, O. S. Søgaaard, C. Camara, P. L. Andersen, and C. Wejse, "Serum procalcitonin in pulmonary tuberculosis," *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 15, no. 2, pp. 251–256, 2011.
- [122] S. H. Adler, E. Chiffoleau, L. Xu, N. M. Dalton, J. M. Burg, A. D. Wells, M. S. Wolfe, L. A. Turka, and W. S. Pear, "Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 6, pp. 2896–2903, 2003.
- [123] S. Rutz, M. Janke, N. Kassner, T. Hohnstein, M. Krueger, and A. Scheffold, "Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 9, pp. 3497–3502, 2008.
- [124] Y. Liu, C. Su, Y. Shan, S. Yang, and G. Ma, "Targeting Notch1 inhibits invasion and angiogenesis of human breast cancer cells via inhibition nuclear factor- κ B signaling," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 8, no. 6, p. 2681, 2016.
- [125] L. Poellinger and U. Lendahl, "Modulating Notch signaling by pathway-intrinsic and pathway-extrinsic mechanisms," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 18, no. 5, pp. 449–454, 2008.
- [126] L. Raymond, S. Eck, E. Hays, I. Tomek, S. Kantor, and M. Vincenti, "RelA is required for IL-1 β stimulation of matrix metalloproteinase-1 expression in chondrocytes," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 15, no. 4, pp. 431–441, 2007.
- [127] B. Pérez-Cabezas, M. Naranjo-Gómez, P. Bastos-Amador, G. Requena-Fernández, R. Pujol-Borrell, and F. E. Borràs, "Ligation of Notch receptors in human conventional and plasmacytoid dendritic cells differentially regulates cytokine and chemokine secretion and modulates Th cell polarization," *J. Immunol.*, p. 1100203, 2011.
- [128] P. L. Lin, H. L. Plessner, N. N. Voitenok, and J. L. Flynn, "Tumor necrosis factor and tuberculosis," in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2007, vol. 12, no. 1, pp. 22–25.
- [129] F. Billiard, C. Lobry, G. Darrasse-Jèze, J. Waite, X. Liu, H. Mouquet, A. DaNave, M. Tait, J. Idoyaga, and M. Leboeuf, "Dll4–Notch signaling in Flt3-independent dendritic cell development and autoimmunity in mice," *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 5, pp. 1011–1028, 2012.
- [130] R. Bassil, B. Zhu, Y. Lahoud, L. V Riella, H. Yagita, W. Elyaman, and S. J. Khoury, "Notch ligand delta-like 4 blockade alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting regulatory T cell development," *J. Immunol.*, p. 1100725, 2011.

ANEXO I

Liberação do Comitê de Ética em Pesquisa FCFRP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 011/2017
kms

Ribeirão Preto, 22 de fevereiro de 2017.

Ao Pós-graduando
Ricardo Cardoso Castro
Orientadora Prof^a. Dr^a. Fabiani Gai Frantz
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**ATIVÇÃO DA VIA NOTCH NA RESPOSTA CONTRA O MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E SUA CORRELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DA FORMA ATIVA DA TUBERCULOSE**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 427 - CAAE nº 62362216.8.0000.5403**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 160ª reunião ordinária, realizada em 10.02.2017.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “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. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF^a. DR^a. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO II

Liberação do Comitê de Ética em Pesquisa HC/FMRP/USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 20 de Fevereiro de 2017

Projeto de pesquisa: “ATIVACÃO DA VIA NOTCH NA RESPOSTA CONTRA O MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E SUA CORRELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DA FORMA ATIVA DA TUBERCULOSE”

Pesquisador responsável: RICARDO CARDOSO CASTRO

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

“O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar”.

Ciente e de acordo:

Dr^a Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador Técnico Científico da
Unidade de Pesquisa Clínica - HCFMRP-
USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das
Clínicas de Ribeirão Preto e Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto

Telefone: 16 3602-2228 / email: cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO III

Termo de Consentimento Pacientes (Controles)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “**Ativação da via NOTCH na resposta contra o *Mycobacterium tuberculosis* e sua correlação com o desenvolvimento da forma ativa da tuberculose**”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof^o. Dra. Fabiani Gai Frantz, Prof^o Dr. Valdes Roberto Bollela, Ricardo Cardoso Castro.

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Sua participação será importante para integrar o grupo **CONTROLE NEGATIVO** desta pesquisa, o qual será usado como parâmetro de comparação com os demais grupos de pacientes. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP em conjunto com os pesquisadores do Hospital das Clínicas com o objetivo de avaliar substâncias presentes no sangue que possam ser utilizados no diagnóstico rápido da tuberculose. Para tal necessitaremos realizar coleta de amostras de sangue que serão utilizadas para separação de células – PBMCs (explicado abaixo) de indivíduos **não** infectados com agente causador da tuberculose para controle quanto à presença da substância na superfície celular através de ensaios imunológicos (ELISA).

O que são PBMCs?

PBMC são células mononucleares do sangue (linfócitos e monócitos), responsáveis pela defesa do corpo. São importantes para combater diversos germes capazes de causar doenças.

Qual o objetivo desta pesquisa?

Esta pesquisa ajudará a relacionar todos os dados já obtidos da pesquisa com tuberculose, para desta maneira encontrar um possível marcador que ajude no diagnóstico da doença. Para tal propósito, a pesquisa busca desenvolver uma nova ferramenta diagnóstica de baixo custo e de detecção rápida dos casos novos de tuberculose.

Como você, paciente, vai participar da pesquisa?

Cada participante contribuirá com 40 mL de sangue, que correspondem aproximadamente a 3 colheres de sopa. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. Os riscos presentes em nosso procedimento são aqueles inerente à coleta de sangue, tais como desconforto e dor da picada, formação de hematomas e riscos biológicos. Para evitar a ocorrência de tais desconfortos e riscos, todas as técnicas de biossegurança serão aplicadas, como a utilização de agulhas e tubos descartáveis, bem como as coletas serão realizadas por profissional capacitado. Em caso de eventuais danos decorrentes dos procedimentos da pesquisa, é assegurado e garantido o direito à indenização apropriada. A coleta de sangue deverá ser feita em indivíduos com diagnóstico negativo para tuberculose e que não apresentam sintomas clínicos da doença.

No geral, essa pesquisa não trará benefícios diretos aos pacientes envolvidos, no entanto, os dados obtidos possibilitará o melhor entendimento da resposta imunológica contra a *M. tuberculosis* em pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose. Além disso, os dados deste estudo poderão ser importantes para identificação de novos alvos terapêuticos e também para descoberta de biomarcadores para o diagnóstico diferencial da tuberculose.

Vale ressaltar que a participação é **voluntária**, podendo o mesmo recusar ou retirar o consentimento em qualquer tempo e/ou fase da pesquisa, a qual deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, sem acarretar nenhum prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão. Se estiver interessado em participar, informamos que o participante ou responsável terá acesso, sempre que julgar necessário ou solicitar, aos resultados de exames, informações referentes à pesquisa e ao tratamento. Além disso, 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, bom como quando houver perdas ou destruição das amostras biológicas, e que as mesmas serão descartadas após a realização das análises e exames necessários e não serão utilizadas em estudos futuros.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com pelos telefones: Ricardo Cardoso Castro (16) 98107-0131, Profª Dra Fabiani Gai Frantz (16) 3315-0241 ou Profº Dr Valdes Roberto Bollela (16) 3602-2747. Também pode entrar em contato diretamente com o Comitê de Ética, unidade responsável por defender os interesses dos participantes da pesquisa e promover a avaliação ética do desenvolvimento da mesma, pelo telefone (16) 3315-4213 ou pelo e-mail cep@fcrp.usp.br.

Sendo assim, se desejar colaborar com o presente estudo, solicitamos que assine este documento. Deverão ser emitidas e assinadas duas vias do mesmo documento, uma para arquivo do pesquisador e outra que ficará com o doador.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

ANEXO IV

Termo de Consentimento Pacientes (TB ativa)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “**Ativação da via NOTCH na resposta contra o *Mycobacterium tuberculosis* e sua correlação com o desenvolvimento da forma ativa da tuberculose**”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof^o. Dra. Fabiani Gai Frantz, Prof^o Dr. Valdes Roberto Bollela, Ricardo Cardoso Castro.

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP em conjunto com os pesquisadores do Hospital das Clínicas com o objetivo de avaliar substâncias presentes no sangue que possam ser utilizados no diagnóstico rápido da tuberculose. Para tal necessitaremos realizar coleta de amostras de sangue que serão utilizadas para separação de células – PBMCs (explicado abaixo) de indivíduos infectados com agente causador da tuberculose para avaliação da presença da substância na superfície celular através de ensaios imunológicos (ELISA).

O que são PBMCs?

PBMC são células mononucleares do sangue (linfócitos e monócitos), responsáveis pela defesa do corpo. São importantes para combater diversos germes capazes de causar doenças.

Qual o objetivo desta pesquisa?

Esta pesquisa ajudará a relacionar todos os dados já obtidos da pesquisa com tuberculose, para desta maneira encontrar um possível marcador que ajude no diagnóstico da doença. Para tal propósito, a pesquisa busca desenvolver uma nova ferramenta diagnóstica de baixo custo e de detecção rápida dos casos novos de tuberculose.

Como você, paciente, vai participar da pesquisa?

Cada participante contribuirá com 40 mL de sangue, que correspondem aproximadamente a 3 colheres de sopa. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. Os riscos presentes em nosso procedimento são aqueles inerente à coleta de sangue, tais como desconforto e dor da picada, formação de hematomas e riscos biológicos. Para evitar a ocorrência de tais desconfortos e riscos, todas as técnicas de biossegurança serão aplicadas, como a utilização de agulhas e tubos descartáveis, bem como as coletas serão realizadas por profissional capacitado. Em caso de eventuais danos decorrentes dos procedimentos da pesquisa, é assegurado e garantido o direito à indenização apropriada. A coleta de sangue deverá ser feita em indivíduos com diagnóstico positivo para tuberculose, identificados através de sinais clínicos ou radiológicos confirmados por resultados microbiológicos, com período de tratamento inferior a trinta dias. Os sinais clínicos incluem tosse, febre, expectoração (catarro), sudorese noturna, perda de peso e dor torácica com duração de 4 semanas ou mais.

No geral, essa pesquisa não trará benefícios diretos aos pacientes envolvidos, no entanto, os dados obtidos possibilitará o melhor entendimento da resposta imunológica contra a *M. tuberculosis* em pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose. Além disso, os dados deste estudo poderão ser importantes para identificação de novos alvos terapêuticos e também para descoberta de biomarcadores para o diagnóstico diferencial da tuberculose.

Vale ressaltar que a participação é **voluntária**, podendo o mesmo recusar ou retirar o consentimento em qualquer tempo e/ou fase da pesquisa, a qual deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, sem acarretar nenhum prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão. Caso não queira participar, o seu atendimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento. Se estiver interessado em participar, informamos que o participante ou responsável terá acesso, sempre que julgar necessário ou solicitar, aos resultados de exames, informações referentes à pesquisa e ao tratamento. Além disso, 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, bom como quando houver perdas ou destruição das amostras biológicas, e que as mesmas serão descartadas após a realização das análises e exames necessários e não serão utilizadas em estudos futuros.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com pelos telefones: Ricardo Cardoso Castro (16) 98107-0131, Prof^a Dra Fabiani Gai Frantz (16) 3315-0241 ou Prof^o Dr Valdes Roberto Bollela (16) 3602-2747. Também pode entrar em contato diretamente com o Comitê de Ética, unidade responsável por defender os interesses dos participantes da pesquisa e promover a avaliação ética do desenvolvimento da mesma, pelo telefone (16) 3315-4213 ou pelo e-mail cep@fcrp.usp.br.

Sendo assim, se desejar colaborar com o presente estudo, solicitamos que assine este documento. Deverão ser emitidas e assinadas duas vias do mesmo documento, uma para arquivo do pesquisador e outra que ficará com o doador.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____