UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

FABIANA ALBANI ZAMBUZI

**Alterações da resposta inflamatória e mudanças epigenéticas como
indicadores dos estágios clínicos da tuberculose pulmonar**

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto)

Ribeirão Preto
2015

FABIANA ALBANI ZAMBUZI

Alterações da resposta inflamatória e mudanças epigenéticas como indicadores dos estágios clínicos da tuberculose pulmonar

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: Profª. Drª. Fabiani Gai Frantz

Ribeirão Preto

2015

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

Zambuzi, Fabiana Albani

Alterações da resposta inflamatória e mudanças epigenéticas como indicadores dos estágios clínicos da tuberculose pulmonar. Ribeirão Preto, 2015.

114 p.:il.; 30cm

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

Orientadora: Frantz, Fabiani Gai.

1. Tuberculose pulmonar.
2. Monócitos.
3. Alterações epigenéticas.
4. Resposta imune.

ZAMBUZI, F. A. Alterações da Resposta Inflamatória e Mudanças Epigenéticas como Indicadores dos Estágios Clínicos da Tuberculose Pulmonar. 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.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, que apesar de todas as dificuldades encontradas deram origem ao que hoje chamo FAMÍLIA, a base da minha vida e a força que motiva minha caminhada.

A vocês que... “guardam no olhar e na pele as marcas de toda uma vida. Guardam em si uma infinidade de conhecimentos que nos transmitem. Aprenderam a lidar com as "feridas" de uma forma admirável. Dão-se intensamente em cada dia... Devolver-lhes o amor é o mínimo que podemos fazer. Tanto para dizer que faltam as palavras...” (Blue Shell)

Por essa razão, como forma agradecimento e homenagem, gostaria de dedicar e reconhecer a vocês minha imensa gratidão e sempre amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que iluminou o meu caminho durante esta etapa, sendo essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia e socorro presente nas horas de angústia.

À minha orientadora, Prof^a Dra Fabiani Gai Frantz, pela oportunidade oferecida e confiança depositada, por todos os ensinamentos transmitidos, pelo carinho e amizade de sempre.

Aos meus pais, João e Adenilse, sem os quais minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada. Por não medirem esforços para que meus sonhos e objetivos se tornem realidade, e que no decorrer da caminhada da vida dedicam o maior amor e carinho, sendo o porto seguro e a força maior para o meu desenvolvimento como ser humano.

À minha irmã, Isabela, que permaneceu ao meu lado nos bons e maus momentos, pela experiência trocada, pelas conversas ao telefone, pelas viagens e esperas. Sua presença foi fundamental para mais esta conquista.

Ao meu namorado, Rogério, pelo apoio, pela compreensão, pelo amor e companhia diária mesmo separados por alguns quilômetros. Pelas horas de conversa e pelos finais de semana compartilhados. Estendo o agradecimento aos seus pais e meus futuros sogros, Maria Amélia e Finoto, por toda preocupação, amor e carinho.

À toda minha família, especialmente aos meus avós, Antônio, Maria, Segundo e Ignez, que sempre me deram atenção, carinho e preciosos conselhos, pela preocupação diária, pelas orações e pelos momentos compartilhados durante os finais de semana. Por todo amor e carinho devotados.

Aos amigos do LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética), Milena, Luana, Leonardo, Verônica, Carol, Thaísa e Priscilla pelas discussões científicas, pela divisão de bancada e, principalmente, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro melhoram tudo o que tenho produzido na vida.

Aos amigos do LIIP, Morgana, Gisele, Karina, Cláudia, Patrícia, Priscilla, Ana, Mouzarllem, Mirella, Francisco, Tânia, Alyne, Carlos, Raphael, Fabiana e a Dra. Lúcia Faccioli pelo apoio e pela amizade.

À Margarida, minha mãe ribeirão-pretana, por toda ajuda desde o início, pelas horas de conversa e conselhos, pelas experiências trocadas e por todo carinho dedicado.

Aos amigos de Paraíso pela companhia e churrasco aos finais de semana, pelas risadas, conversas não científicas, pelo carinho e amizade de sempre.

Aos amigos de Botucatu, que apesar da correria da vida acadêmica/ universitária e os quilômetros de distância que nos separam, mantiveram-se presentes nesta etapa, em momentos de conversa, carinho e descontração. Especialmente, às minhas amigas Daniele (Trupikei) pela presença constante e amizade sincera e Viviane (Pint) pela companhia diária, pela amizade e por dividir comigo a casa, os problemas e as alegrias durante este período.

À toda equipe do Hospital das Clínicas, especialmente ao Dr. Valdes Bollela, pela parceria no desenvolvimento e realização deste estudo, pelos auxílios nas análises dos dados e discussões científicas. Estendo tal agradecimento aos funcionários das Unidades Básicas de Saúde de Ribeirão Preto, que contribuíram muito para que o trabalho fosse realizado.

A todos os pacientes atendidos no HC-FMRP/USP e nas Unidades de Saúde de Ribeirão Preto, bem como a todos os voluntários que através de doação de amostras de sangue foram parte fundamental para o desenvolvimento do trabalho. Sem a participação de vocês nada do que foi desenvolvido seria possível.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela infraestrutura. Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela formação diferencial.

Aos membros da banca pela disponibilidade e gentileza em contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro durante desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos, que direta ou indiretamente, desempenharam papel fundamental na conclusão de mais uma etapa das muitas que ainda surgirão no decorrer da vida. A todos vocês meu sincero MUITO OBRIGADA.

“O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã. Faça o bem assim mesmo. Veja que, ao final das contas, é tudo entre você e Deus! Nunca foi entre você e os outros.”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

ZAMBUZI, F. A. **Alterações da Resposta Inflamatória e Mudanças Epigenéticas como Indicadores dos Estágios Clínicos da Tuberculose Pulmonar**. 2015. 114f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São, Ribeirão Preto, 2015.

A tuberculose representa um sério problema de Saúde Pública para o Brasil e o mundo. Estima-se que cerca de um terço da população mundial seja infectado pelo bacilo, sendo que 95% destes indivíduos desenvolvem a forma latente da tuberculose. Dessa forma, encontrar um marco entre o que faz o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) induzir no hospedeiro uma doença ativa ou sua forma latente tem sido o objeto de estudo de diferentes grupos de pesquisa. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi correlacionar mudanças na resposta imune desenvolvida por monócitos de pacientes em diferentes estágios da tuberculose pulmonar com alterações epigenéticas, e então com aspectos clínicos de cada estágio. Nosso estudo incluiu 17 pacientes com a doença ativa, 14 indivíduos com tuberculose latente e 16 controles não infectados. A partir de sangue periférico, foi coletado plasma para quantificação de citocinas, sCD163 e sCD14. Complementarmente, monócitos foram purificados para avaliação da ativação imune através da quantificação de citocinas e espécies reativas de oxigênio mediante estimulação *in vitro* com Mtb inativado por calor, bem como PCR “array” para detectar expressão de enzimas de repressão ou ativação epigenética entre os grupos e avaliação do padrão de metilação global. Pacientes com tuberculose ativa apresentaram níveis plasmáticos elevados de citocinas como IL-6, IP-10, TNF- α , IL-12, bem como IL-5. Dentre as citocinas, TNF- α , IL-5, IL-6 e IP-10 permitiram diferenciar indivíduos latentes dos pacientes com tuberculose ativa. Também demonstramos que maior número de correlações entre as citocinas foi observado nos pacientes com a doença ativa, indicando um estado geral mais ativado do sistema imune. Níveis plasmáticos de sCD163 e sCD14 estavam elevados nos pacientes quando comparados com indivíduos latentes e controles, e poderiam também diferenciar a tuberculose ativa. Tais níveis aumentados correlacionam-se com o estado ativado de monócitos dos pacientes, que produzem maior quantidade de espécies reativas de oxigênio e tendem a produzir mais citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- α . Este perfil parece ser modulado por modificações epigenéticas,

uma vez que monócitos de pacientes com tuberculose pareceram mostrar menor expressão de enzimas responsáveis por mudanças relacionadas à repressão e maior expressão de enzimas relacionadas à ativação da expressão gênica, bem como redução no padrão global de metilação do DNA genômico, sugerindo maior atividade destas células. Finalmente, uma vez que pacientes com tuberculose apresentaram níveis elevados de alguns mediadores, correlacionamos estes com o grau de lesão pulmonar, e consequentemente, com a gravidade da doença. Nós mostramos que dentre os marcadores, TNF- α e sCD163 correlacionaram-se positivamente com a progressão da tuberculose. Assim, concluímos que em relação aos indivíduos controle e com TB latente, os pacientes com tuberculose ativa apresentam o sistema imune em maior estado de ativação, e ainda, que alterações epigenéticas podem ser as responsáveis pela modulação observada. Dentre os fatores aumentados nos pacientes, TNF- α , IL-6, IP-10, IL-5, sCD163 e sCD14 podem diferenciar os pacientes com doença ativa dos demais indivíduos analisados, e ainda sCD163 e TNF- α podem atuar como indicativos da gravidade da tuberculose.

Palavras Chave: tuberculose pulmonar, monócitos, alterações epigenéticas, resposta imune

ABSTRACT

ZAMBUZI, F. A. **Alterations in the Inflammatory Response and Epigenetic changes as Indicators of Clinical Stages of Pulmonary Tuberculosis.** 2015. 114f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São, Ribeirão Preto, 2015.

Tuberculosis is a major public health problem for Brazil and worldwide. It is estimated that about one third of the world population is infected with the bacillus, and 95% of those individuals have the condition in the latent form. Thus, finding a hallmark between what makes the *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) induces in the host an active disease or its latent form has been the subject of different research groups. In this context, the objective of this study was to correlate changes in the immune response developed by monocytes from patients at different stages of pulmonary tuberculosis with epigenetic alterations and then, with clinical aspects of each stage. Our study included 17 patients with active disease, 14 individuals with latent tuberculosis and 16 uninfected controls. From the peripheral blood, plasma was collected for cytokine and CD163s, sCD14 quantification. In addition, monocytes were purified to evaluation of the immune activation through cytokine and reactive oxygen species quantification upon *in vitro* stimulation with heat-killed Mtb, as well as PCR array for epigenetic repression or activation enzymes were performed to detect epigenetic changes between the groups and evaluation of the global methylation profile. We have shown that patients with active tuberculosis have increased plasma levels of cytokines such as IL-6, IP-10, TNF- α , IL-12, as well as IL-5. Among these cytokines, TNF- α , IL-5, IL-6 and IP-10 could differentiate latent-infected from TB patients. We also showed that patients with active disease presented higher number of correlations between plasma cytokines, indicating an activated state of the immune system. The plasma levels of sCD163 and sCD14 were more elevated in patients than latent and control individuals, and might differentiate TB active from these other groups. These increased levels of biomarkers correlate with the activated state of monocytes from patients, which produced raised quantities of reactive oxygen species and tended to produced more pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α . This profile seems to be modulated by epigenetic modifications, since monocytes from patients with tuberculosis seemed to show reduced expression of enzymes responsible for changes related to repression and enhanced expression

of enzymes responsible for activation of gene expression, and in addition, these patients presented reduction in the percentage of global methylation of genomic DNA, suggesting increased activity of these cells when compared to the other groups. Finally, once tuberculosis patients presented increased levels of some mediators, we correlated these with the degree of lung injury, and consequently tuberculosis severity. We have showed that TNF- α and sCD163 were correlated with disease progression in tuberculosis. In conclusion, we demonstrated that patients with active tuberculosis are more activated than the other groups, and epigenetic alterations might be responsible for these modulations, indicated by the alteration of the enzymes and methylation pattern analyzed. Among the cytokines/chemokines differentially expressed TNF- α , IL-6, IP-10, IL-5 and monocyte activation markers, sCD163 and sCD14 could discriminate between active disease from others, and also sCD163 and TNF- α could indicate tuberculosis severity.

Key words: pulmonary tuberculosis, monocytes, epigenetic changes, immune response

LISTA DE ABREVIATURAS

AcH4	Acetilação da histona 4
ADAM17/TACE	<i>Metallopeptidase domain 17/ tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
ASH1L	<i>Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L</i>
ATF2	<i>Activating Transcription Factor 2</i>
BCG	<i>Bacillus-Cammette-Guérin</i>
CARM1	<i>Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase</i>
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>
CCL19	<i>C-C motif chemokine 19</i>
CCL22	<i>C-C motif chemokine 22</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CD4	<i>Cluster differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster differentiation 8</i>
CD14	<i>Cluster differentiation 14</i>
CD163	<i>Cluster differentiation 163</i>
CH3	Grupamento Metil
CpG	<i>C phosphate G</i>
CSE	Centro de Saúde Escola
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH	<i>Delayed Hypersensitivity Reaction</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>
DNMT2	<i>DNA methyltransferase 2</i>
DNMT3	<i>DNA methyltransferase 3</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FCFRP/USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São

	Paulo
FMRP/USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony- stimulating factor
HATs	Histona-acetiltransferases
HC/FMRP/USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HDACs	Histona-Acetiltransferases
HDMs	Histonas-Demetilase
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HKs	Histona-Kinases
HMTs	Histona-metiltransferases
Hp-Hb	Haptoglobin-Hemoglobin
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H37Rv	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
H3K4me3	Trimetilação da lisina 4 da histona 3
H3K27me2	Dimetilação da lisina 27 da histona 3
H3K27me3	Trimetilação da lisina 27 da histona 3
H4	Histona 4
IFN- α 2	Interferon-alfa2
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12(p70)	Interleucina 12, subunidades p35 e p40
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18

IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
KAT	K (lysine) Acetyltransfrase
KDM5B/6B	K (lysine) demethylase 5B/6B
KMT 2C/2E	K (lysine) Methyltransferase 2C/2E
LPS	Lipopolissacarídeo
LAM	Lipoarabinomanana
MBD 2/3	<i>Methyl-CpG binding domain protein 2/3</i>
MECP2	<i>Methyl-CpG binding protein 2</i>
MIN	Unidade de Moléstias Infecciosas
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein - 1α</i>
MIP-1 β	<i>Macrophage inflammatory protein - 1β</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
μ g	Micrograma
mL	Mililitro
μ M	Micromolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
ng	Nanograma
NKT	<i>Natural Killer T</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOX-2	<i>NADPH oxidase 2</i>
Nurd	<i>Nucleosome Remodeling Deacetylase</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR	Proteína C Reativa
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PNE	Unidade de Pneumologia Adulta
PPD	Derivado Proteico Purificado

PRMT5	<i>Protein arginine methyltransferase 5</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura celular
ROS	Reactive Oxygen Species
sCD14	<i>Soluble CD14</i>
sCD163	<i>Soluble CD163</i>
SETD1B	<i>SET Domain Containing 1B</i>
Sin3A	<i>SIN3 transcription regulator Family member A</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SMYD3	<i>SET and MYND domain containing 3</i>
SRCR	<i>Scavenger Receptor Cysteine-Rich</i>
SUV39H1	<i>Histone-lysine N-methyltransferase</i>
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Resistente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	<i>Type 1 T helper cell</i>
Th2	<i>Type 2 T helper cell</i>
Th17	<i>Type 17 T helper cell</i>
TLRs	<i>Toll-like receptor</i>
TLR2	<i>Toll-like receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TLR8	<i>Toll-like receptor 8</i>
TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TNFR2	<i>Tumor necrosis receptor 2</i>
UBDS	Unidade Básica de Saúde

LSTAS DE FIGURAS

Figura 1-	Representação esquemática do delineamento experimental desenvolvido no estudo.....	39
Figura 2-	Quantificação de citocinas e quimiocinas no plasma de indivíduos controle, indivíduos com infecção latente e pacientes com tuberculose.....	54
Figura 3-	Rede de Interação entre as citocinas plasmáticas.....	62
Figura 4-	Quantificação de níveis plasmáticos de sCD163 nos indivíduos controle, com infecção latente e pacientes com tuberculose ativa.....	64
Figura 5-	Quantificação de níveis plasmáticos de sCD14 nos indivíduos controle, com infecção latente e pacientes com tuberculose ativa.....	64
Figura 6-	Representações da assinatura global da tuberculose pulmonar.....	67
Figura 7-	Classificação da lesão pulmonar em pacientes com a doença ativa.....	69
Figura 8-	Correlação entre níveis plasmáticos de marcadores de ativação de monócitos, citocinas e quimiocinas com lesão pulmonar em pacientes com doença ativa.....	70
Figura 9-	Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de monócitos estimulados com Mtb.....	72

Figura 10-	Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por monócitos de indivíduos controle, indivíduos com infecção latente e pacientes com tuberculose.....	73
Figura 11-	Expressão de enzimas de modulação epigenética relacionadas à repressão gênica.....	75
Figura 12-	Expressão de enzimas de modulação epigenética relacionadas à ativação gênica.....	76
Figura 13-	Porcentagem de metilação global do DNA genômico em indivíduos controle, latente e pacientes com a doença ativa.....	78
Figura 14-	Esquema final dos resultados encontrados evidenciando uma proposta de bioassinatura da tuberculose ativa.....	92
Figura A-	<i>Dot plot</i> representativo da pureza obtida durante os experimentos realizados.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Perfil dos grupos incluídos no estudo.....	42
Tabela 2-	Correlações estabelecidas ente citocinas/quimiocinas plasmáticas de indivíduos Controle.....	58
Tabela 3-	Correlações estabelecidas ente citocinas/quimiocinas plasmáticas de indivíduos TB Latente.....	59
Tabela 4-	Correlações estabelecidas ente citocinas/quimiocinas plasmáticas de indivíduos TB Ativa.....	60
Tabela 5-	Correlações estabelecidas ente citocinas/quimiocinas plasmáticas de indivíduos TB Ativa em relação aos indivíduos com infecção latente.....	61

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1	Tuberculose: Problema, importância e desafios	26
1.2	Tuberculose e Resposta imune	27
1.3	Marcadores de ativação de monócitos	30
1.4	Alterações epigenéticas e o sistema imune	32
2.	OBJETIVO	36
3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Casuística	41
4.2	Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	42
4.3	Avaliação da ativação de monócitos <i>in vitro</i>	43
4.4	Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS)	43
4.5	Ensaio para detecção de citocinas e quimiocinas em amostras de plasma e sobrenadante de cultura celular	44
4.6	Ensaio para detecção de CD163 e CD14 solúveis em amostra de plasma	44
4.7	Avaliação da lesão pulmonar dos pacientes com tuberculose ativa	45
4.8	Extração de RNA total dos monócitos isolados de sangue periférico e síntese de cDNA	45
4.9	Análise da expressão de enzimas de repressão epigenética	46
4.10	Análise da expressão de enzimas de ativação epigenética	47
4.11	Extração de DNA genômico	47
4.12	Determinação do padrão de metilação global do DNA	48
4.13	Análises estatísticas	48
5.	RESULTADOS	50
5.1	Aumento de correlações entre as citocinas/quimiocinas plasmáticas indicam maior grau de ativação imune nos pacientes com doença ativa	51
5.2	Marcadores de ativação de monócitos e macrófagos estão aumentados em pacientes com doença ativa	63
5.3	Frequência aumentada de indivíduos com níveis elevados de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação podem caracterizar uma bioassinatura associada à tuberculose pulmonar ativa	65

5.4	Grau de lesão pulmonar em pacientes com tuberculose ativa correlacionam-se positivamente com níveis plasmáticos de sCD163 e TNF- α	68
5.5	Monócitos de pacientes com tuberculose ativa apresentam maior ativação imune mediante estimulação com Mtb.....	71
5.6	Pacientes com tuberculose ativa parecem apresentar alterações na expressão de enzimas responsáveis pelas modificações epigenéticas.....	74
5.7	Metilação global do DNA mostrou-se reduzida em pacientes com tuberculose ativa.....	77
6.	DISCUSSÃO.....	79
7.	CONCLUSÕES.....	93
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
	ANEXOS.....	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose: Problema, importância e desafios

A tuberculose (TB) é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), bacilo álcool ácido resistente, que foi primeiramente descrito em 1882, pelo pesquisador Robert Koch e tem afetado o homem por milhares de anos [1], sendo considerado o segundo microrganismo que mata mais indivíduos quando comparado a qualquer outro agente infeccioso sozinho [2]. A doença afeta principalmente os pulmões, sendo 70% dos casos de TB pulmonar, embora possa se disseminar para outros órgãos como linfonodos, ossos e meninges, que caracterizam os casos de TB extrapulmonar ou miliar [3, 4].

Embora seja uma doença infecciosa bastante antiga e com tratamento e cura já bem estabelecidos, estima-se que no ano de 2013 aproximadamente 9 milhões de pessoas desenvolveram a doença e 1,5 milhões morreram desta enfermidade [5]. Cerca de um terço da população mundial é infectada pelo Mtb, apresentando a forma latente da doença [5], e desses indivíduos, 5 a 10% poderão desenvolver a doença ao longo da vida [6].

No panorama mundial, o Brasil é o único país da América Latina incluído entre as 22 nações responsáveis por 82% do total de casos de TB no mundo [5]. Estima-se que todos os anos, em torno de 80.000 novos casos da doença são notificados ao Ministério da Saúde, sendo a maioria dos casos da forma pulmonar e bacilífera. Entretanto, a mortalidade por TB tem apresentado tendência de redução no Brasil, e a estimativa é que na última década a taxa de incidência caiu de 42,8 para 36 casos para cada 100 mil habitantes [7]. Ainda assim, a cada ano é observado no Brasil a ocorrência de mais de 5.000 mortes devido à TB [7].

Nas últimas décadas, as políticas públicas, a sociedade e mesmo a comunidade científica negligenciaram o controle efetivo da tuberculose devido à falsa ilusão de que o problema estava resolvido e/ou sob controle [2]. Do ponto de vista social e econômico, vários fatores contribuem para a manutenção deste quadro, destacando as desigualdades sociais, os fluxos migratórios e as deficiências do sistema de saúde [8].

Entretanto os maiores desafios encontrados para o controle da tuberculose são: a ineficácia da vacina disponível, o BCG, que apresenta percentual de proteção de 2 a 80% dependendo da população avaliada [9,10]; a ausência de técnicas mais rápidas e sensíveis para o diagnóstico, uma vez que este baseia-se na detecção

direta e cultura do bacilo como padrão ouro, os quais tem como maior limitação o tempo necessário para a confirmação diagnóstica, que pode chegar até doze semanas [11]; e o tratamento, que apesar de efetivo, adota uma associação medicamentosa com sérios efeitos colaterais e tempo mínimo de 6 meses, o que leva ao abandono antes da sua conclusão, aumentando o risco de recidiva da doença, além de permitir o surgimento de bacilos resistentes, especialmente aos antibióticos de escolha rifampicina e isoniazida, levando a ocorrência de casos de TB-MDR, ou em situações extremas de resistência, a todas as drogas de primeira linha e às principais drogas de segunda linha, o que é denominado de TB extremamente resistente (TB-XDR) [12-13]. Desta forma, embora o último relatório da OMS [5] tenha relatado melhora no quadro mundial da doença, ainda existem muitos desafios e descobertas a serem feitas para que a doença seja efetivamente controlada, constituindo assim um importante campo de estudo.

1.2 Tuberculose e Resposta imune

A resposta imune contra o bacilo é complexa e ainda não sabemos quais fatores do hospedeiro determinam porque alguns indivíduos são protegidos e outros desenvolvem a doença ativa, o que dificulta o desenvolvimento de novas vacinas, testes diagnósticos e tratamentos, apesar de que os fatores imunológicos que controlam a infecção já são bem compreendidos [14].

A transmissão do Mtb acontece através de gotículas, liberadas quando um indivíduo infectado tosse, espirra ou fala, e as mesmas são inaladas por um novo hospedeiro [15]. Ao atingir o espaço alveolar, o Mtb pode infectar macrófagos alveolares residentes, neutrófilos e células dendríticas, levando a liberação de peptídeos microbianos, citocinas e quimiocinas. Os macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra patógenos no pulmão, constituindo cerca de 95% das células encontradas no lavado broncoalveolar [16]. A entrada do Mtb nestas células é mediada por diversos receptores, dentre os quais estão “scavenger receptors”, receptores do complemento, receptores de manose e receptores do tipo Toll (TLRs) [17,18].

Os receptores do tipo Toll estão entre os mais importantes na interação com o Mtb, sendo TLR2, TLR4 e TLR9, e possivelmente o TLR8, associados ao

reconhecimento de diferentes antígenos microbianos [19, 20]. Além de receptores de superfície, receptores presentes no citoplasma são importantes para a ativação da resposta imune. Peptidoglicanos da parede celular do Mtb podem ser reconhecidos por receptores da família do NLR (NOD like receptors), essenciais para a ativação dos macrófagos e liberação de citocinas como IL-6, TNF- α e IL-12 [21]. Ainda no citoplasma, pode ocorrer a ativação do inflamassoma, e consequente produção de citocinas inflamatórias como IL-18 e IL-1 β [20, 22].

Após o reconhecimento e internalização do bacilo é desencadeada uma série de eventos intracelulares que culminam na eliminação do patógeno, principalmente por meio de mecanismos microbicidas dos macrófagos, tais como produção de espécies reativas de oxigênio, liberação de enzimas lisossomais e apoptose [23-25]. Porém, pelo fato do Mtb estabelecer uma infecção persistente e poder resistir à resposta imune inata, a eliminação do bacilo depende de mecanismos inatos e também adaptativos da resposta imune. Aproximadamente de 8 a 12 dias após a infecção, células dendríticas residentes no pulmão, internalizam o bacilo e, sob influência de IL-12 e quimiocinas como CCL19 e CCL22, migram para os linfonodos drenantes onde exercem sua função de apresentadoras de antígeno para as células T, dando início a resposta imunológica adaptativa contra o patógeno. Tal ativação ocorre preferencialmente em um padrão Th1 de resposta, e estes linfócitos ativados migram de volta para o pulmão de maneira dependente de quimiocinas, cerca de 14 a 17 dias após a exposição [14, 26].

Células NKT e T $\gamma\delta$ são as primeiras populações de linfócitos a chegar ao sítio infeccioso, precedendo as populações de CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ efectoras [27, 28]. As células, presentes neste microambiente, iniciam uma cascata de produção de citocinas, predominantemente IFN- γ , que promove o recrutamento de mais macrófagos e células T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ para o local da infecção [17]. Indivíduos com deficiência na produção ou no receptor de IFN- γ mostram-se mais susceptíveis a infecção pelo bacilo [29]. As células T CD4 $^{+}$ funcionam como as principais produtoras de citocinas [30], enquanto as CD8 $^{+}$, além de produzirem citocinas, atuam de maneira citotóxica promovendo a lise das células infectadas via ação do conteúdo dos grânulos (perforinas e granzimas) ou via interação de Fas/FasL [31,32].

Além do IFN- γ , outras citocinas apresentam papel de destaque na resposta protetora contra a TB. A IL-17, produzida pelas células Th17 e T $\gamma\delta$, é uma citocina

pró-inflamatória capaz de induzir produção de quimiocinas e recrutamento de células inflamatórias que parecem ser importantes no controle inicial da infecção [33, 34]. Já na fase aguda, é possível detectar TNF- α , atuando em sinergismo com o IFN- γ no recrutamento de células e na manutenção da organização do granuloma [35, 36]. Estudos demonstraram que, assim como em pacientes deficientes em IFN- γ , a deficiência de TNF- α também aumenta a susceptibilidade à infecção pelo bacilo [37].

A resposta contra o bacilo culmina classicamente na formação do granuloma, que corresponde à reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) formada em resposta à persistência do Mtb no interior dos macrófagos. Tal estrutura é composta por uma massa central de macrófagos infectados, macrófagos estimulados que foram diferenciados em células gigantes multinucleadas, células epitelióides e neutrófilos [38], circundados por linfócitos T CD4+ bem como células T CD8+ e B, e fibroblastos que criam uma cápsula fibrótica periférica, deixando o bacilo confinado em seu interior [39, 40]. Estudos recentes tem demonstrado que o granuloma pode ser utilizado pelo Mtb como forma de disseminar a infecção, uma vez que ao induzir o recrutamento de macrófagos, o bacilo pode infectar essas células que devido a capacidade de migração podem atingir outros nichos e gerar novos granulomas [41, 42]. Na maioria dos casos o granuloma contém a infecção, limitando o crescimento e a disseminação do bacilo, porém o bacilo consegue sobreviver no interior do granuloma, o que caracteriza o estado de TB latente.

Apesar dos diversos recursos apresentados pelo sistema imune para controlar a infecção, o Mtb desenvolveu uma série de mecanismos que permitem a evasão e/ou subversão da resposta imunológica, sendo exemplos importantes: a evasão do fagossomo [43], a inibição da formação do fagolisossomo [44], a inibição da produção de citocinas inflamatórias [45] e a modulação dos mecanismos de morte celular [46].

Além dos mecanismos de escape desenvolvidos pelo microrganismo, quebras no equilíbrio entre o sistema imunológico do hospedeiro e o patógeno, como ocorre em indivíduos imunossuprimidos, acarretam o afrouxamento da estrutura granulomatosa, que resulta na reativação do bacilo e disseminação da doença [47]. Citocinas como IL-10 e TGF- β apresentam papel importante nesta modulação da resposta imune, sendo sua produção exacerbada detectada em indivíduos com TB ativa, nos quais atuam suprimindo a resposta imune celular ao bacilo neste indivíduos, uma vez que apresentam ações anti-inflamatórias [48]. Além da

supressão induzida por tais citocinas, a ação imunomoduladora pode ainda ser benéfica para a resposta imune, sendo o balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias importante no desenvolvimento de respostas efetoras no controle da infecção. Neste sentido, a IL-10 pode atuar controlando a apoptose mediada por TNF- α e diminuir a lesão tecidual gerada na resposta contra o Mtb. Foi demonstrado que macrófagos humanos infectados com Mtb *in vitro* (H37Rv) produzem IL-10, o qual modula a ação de TNF- α através de indução de aumento de TNFR2 solúvel e formação de complexos. Tal modulação culmina na redução dos efeitos inflamatórios gerados pelo TNF- α , levando a redução na apoptose e consequente redução do dano tecidual nos indivíduos infectados [49].

1.3. Marcadores de ativação de monócitos

Monócitos e macrófagos são os principais alvos do Mtb, e a capacidade inata destas células em lidar com a infecção definem a progressão da tuberculose [50]. Os monócitos, por sua vez, estão presentes no sangue periférico e correspondem à principal fonte de macrófagos teciduais, uma vez que são recrutados durante a resposta imune contra o Mtb para o sítio da infecção com a finalidade de eliminar o patógeno [51, 52]. Sendo assim, o fenótipo, o estado de ativação e a capacidade funcional destas células são características importantes e podem estar relacionadas com o desenvolvimento da tuberculose. Neste sentido, fatores circulantes que derivem de macrófagos e monócitos que possam ser detectados em fluidos biológicos e sejam capazes de expressar ativação destas populações de células são de extrema importância como possíveis biomarcadores em processos patológicos [53].

Dentre estes fatores, o CD163 corresponde a um receptor de membrana pertencente à família de “scavenger receptors” ricos em cisteína (SRCR), expresso exclusivamente por células da linhagem monocítica, como macrófagos, monócitos e algumas células dendríticas [54, 55]. A função principal de CD163 está relacionada à captura de complexo haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb) [56], além de outras funções, como a adesão de eritroblastos [57] e a detecção imune de bactérias [58].

Adicionalmente ao receptor de membrana, uma variante solúvel do CD163 (sCD163) pode ser detectada no plasma e outros fluidos biológicos [59]. Tem sido proposto que tal variante solúvel corresponda ao produto da clivagem do CD163 de

membrana [60] por ação da enzima conversora do fator de necrose tumoral α (ADAM17/TACE) [61], que fica localizada na membrana celular e responde rapidamente a estímulos fisiológicos, levando a clivagem do CD163, bem como do domínio extracelular do TNF- α e de outras 40 proteínas ligadas a membrana [62]. Estudos *in vitro* mostraram que a clivagem do CD163 pode ser induzida por estímulos inflamatórios, tais como ativação de receptores do tipo Toll (TLRs) por LPS ou PMA (phorbol-12-myristate 13-acetate) [60, 63], estresse oxidativo [64] e ligação cruzada de receptores Fc γ [65].

Independente de estímulos inflamatórios, pequenas quantidades de sCD163 são clivadas constitutivamente [59]. Adicionalmente, tem sido demonstrado que níveis elevados da porção clivada do receptor em fluidos biológicos, principalmente no soro ou plasma, pode estar relacionado a processos patológicos que envolvam intensa atividade das células do sistema imune, tendo sido relacionado a infecções crônicas. Níveis elevados de sCD163 foram detectados em pacientes com malária, os quais correlacionam com o aumento de TNF- α , indicando que a clivagem é mediada por um agente comum [66]. Também tem sido descrito que os níveis de sCD163 são aumentados em pacientes HIV+, e que os mesmos reduzem após terapia antirretroviral e correlacionam com a carga viral e contagem de células T CD4+, podendo atuar como um marcador de progressão da doença [67-69]. E ainda, que o aumento da variante solúvel em associação com outros marcadores de ativação de monócitos, como CD14 solúvel (sCD14), proteína C reativa (PCR) e D-dímer podem contribuir para o desenvolvimento de eventos não relacionados a AIDS, como doenças cardiovasculares em pacientes infectados com o vírus [70].

Dentre os outros marcadores, CD14 desempenha papel importante na resposta do hospedeiro a bactérias [71]. Tal molécula corresponde a um receptor associado a membrana que atua reconhecendo com alta afinidade LPS de bactérias Gram negativas e componentes da membrana de células Gram positivas. Assim como o CD163, tal receptor está presente na superfície de monócitos e macrófagos, e a sua ligação aos antígenos desencadeia ativação destas células e consequente aumento de mediadores inflamatórios [72-74]. Além de reconhecer LPS, já foi descrito que CD14 também pode ser ligar a lipoarabinomanana (LAM), glicoproteína presente na membrana celular de micobactérias, desempenhando assim papel importante na resposta contra o bacilo na tuberculose [74, 75]. A forma acoplada à membrana pode sofrer clivagem proteolítica e constituir a variável solúvel do CD14

(sCD14), que também é capaz de reconhecer antígenos, podendo ligar-se ao LPS e desempenhar papel regulador na resposta contra endotoxinas bacterianas [76, 77].

Da mesma forma que os outros marcadores solúveis, sCD14 pode ser detectado no plasma e fluidos biológicos, nos quais pode ser utilizado como marcador de condições inflamatórias. A concentração plasmática de tal marcador está correlacionada com resposta de fase aguda para septicemia, queimaduras e trauma [78].

Além de representarem marcadores de ativação de macrófagos e monócitos em várias doenças, estudos tem mostrado que tanto sCD163 como sCD14 podem atuar também como marcadores de gravidade da infecção [59]. Níveis de sCD163 foram associados a alta mortalidade e morbidade, mesmo em indivíduos saudáveis [53], enquanto a concentração sérica de sCD14 mostrou-se correlacionada com atividade da doença e redução na atividade pulmonar em pacientes com sarcoidose [79], com estágio da doença na leucemia [80], bem como com progressão da doença em pacientes infectados com HIV [70, 81].

1.4. Alterações epigenéticas e o sistema imune

Além de marcadores celulares e mediadores produzidos pelas células do sistema imune, mecanismos induzidos pela infecção, que possam modificar a expressão gênica e consequentemente a produção de proteínas ou ainda fatores que alterem a susceptibilidade do indivíduo, são de grande interesse nesse estudo como possíveis biomarcadores da resposta imunológica.

Neste contexto enquadram-se as alterações epigenéticas, que correspondem às mudanças na expressão gênica não relacionadas à mutação na sequência de nucleotídeos no DNA, mas sim a padrões de modificação química do DNA e/ou de histonas associadas e microRNAs que determinam os estados de atividade dos genes, ou seja, que resultam em alterações na acessibilidade física ao DNA atuando como ativadores ou silenciadores da expressão gênica [82, 83].

As alterações epigenéticas são mecanismos importantes para a manutenção do desenvolvimento normal do indivíduo, pois regulam diversos processos celulares fisiológicos como diferenciação, embriogênese, “imprinting” e inativação do cromossomo X [84]. A ocorrência de alterações desta natureza é fortemente modulada por fatores ambientais, como nutrição, estresse, patógenos e processos

patológicos, como câncer e doenças autoimunes [85, 86]. Por este motivo, em processos patológicos, a resposta imune pode também ser regulada por mecanismos epigenéticos.

Dentre as alterações, a metilação do DNA consiste na inserção de radical metil (CH₃) no carbono 5 de citosina, quando a mesma é seguida de guanina, em regiões conhecidas como ilhas de CpG e corresponde a modificação epigenética mais bem caracterizada e reconhecida como mecanismo de silenciamento da expressão gênica [87]. Por sua vez, as modificações na cauda de proteínas que compõem o core de histonas, como H2A, H2B, H3 e H4, podem direcionar o enrolamento ou desenrolamento do DNA associado, e assim controlar o estado de ativação gênico. Esse estado de ativação ou repressão gerado por tais modificações dependem da natureza química e da localização da modificação no core de histonas [88]. Por exemplo, a acetilação de resíduos específicos de aminoácidos parece atuar como ativador transcricional, independente de sua localização [89], enquanto a metilação pode ser tanto ativadora quanto repressora da expressão gênica, dependendo do tipo e da localização da modificação [90]. Sabe-se que a acetilação da histona 4 (AcH4) ou a tri-metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me₃) geralmente aumentam o acesso ao DNA para fatores de transcrição [91], em contrapartida, a di- ou tri-metilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me₂ ou me₃) fecham o DNA resultando em silenciamento gênico [92].

O perfil de modulação epigenética é controlado por enzimas, que diretamente adicionam ou removem as modificações covalentes ao DNA e/ou à cauda de histonas. A metilação do DNA é regulada por enzimas do tipo DNA-metiltransferases (DNMTs), sendo três classes identificadas em mamíferos: DNMT1 [93], DNMT2 [94] e DNMT3A/B [95]. Já as modificações na cauda de histonas, nas quais estão incluídas as alterações como acetilação por ação de enzimas histona-acetiltransferases (HATs), metilação por histona-metiltransferases (HMTs), fosforilação por histona-quinases (HKs) que adicionam as modificações, e as histonas demetilases (HDMs) e as histonas deacetilases (HDACs) que removem esses grupos. Muitas enzimas são descritas em cada uma destas famílias, que podem interagir entre si e com outros mecanismos formando complexos responsáveis pelo controle da expressão gênica [96]. Dentre os complexos estão o Complexo de Remodelação do Nucleossomo e Deacetilase (NuRD) [97] e o

Complexo Sin3 [98], responsáveis pela deacetilação de histonas, estando dessa forma, relacionados com o silenciamento gênico.

Tais modificações tem se tornado um campo de estudo em expansão na área imunológica, uma vez que parecem estar ligadas a ativação do sistema imune e de suas funções efetoras [99]. Em algumas doenças, como na sepse, há associação entre alterações epigenéticas e funções alteradas do sistema imune. Neste caso, como uma maneira de compensar o dano causado pela resposta pró-inflamatória desenvolvida para combater a infecção, o organismo inicia uma Síndrome de Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS) [100], e recentemente foi descrito que a indução da CARS está sob controle da regulação epigenética de loci gênicos em células imunes maduras [99]. Desta forma, na sepse a redução da ativação de macrófagos e células dendríticas e, conseqüentemente de suas funções efetoras estão correlacionados a assinaturas epigenéticas dos genes de citocinas e quimiocinas, que incluem padrões de acetilação e metilação de histonas, como a metilação de H3K27 no promotor de gene da IL-12 [101]. A função das células da imunidade adquirida também parece ser modulada por estas modificações, que parecem regular a diferenciação das células nos padrões Th1, Th2 ou Th17 [102]. No caso da resposta compensatória na sepse, há silenciamento do padrão Th1 em detrimento da resposta Th2 [99].

Além disso, estudos recentes também tem mostrado que essas modificações epigenéticas são fundamentais para a determinação do padrão de ativação de macrófagos e os ativam para o padrão M₂ *in vitro* [103], tendo grande destaque no controle da replicação do HIV [103,104] e no desenvolvimento de doenças infecciosas [103]. Também tem sido demonstrado que alterações epigenéticas pré-existent em populações celulares específicas podem afetar a susceptibilidade do hospedeiro frente à infecção, como demonstrado em infecções virais, preferencialmente nos casos de HIV [104, 105]. Quanto à TB, dados da literatura indicam associação da doença com alterações na metilação do gene da vitamina D. Tais variações foram encontradas quando comparados grupos infectados e grupos controles, assim como em diferentes grupos étnicos. Dessa maneira, alterações no epigenoma parecem estar relacionadas com o desenvolvimento da TB, e ainda permitiriam diferenciar os casos de TB latente da doença ativa, assim como monitorar o tratamento [106]. Sendo assim, é de extrema importância a determinação de mudanças epigenéticas que culminem em alterações no perfil

proteico das células infectadas por Mtb, e conhecer como estas mudanças estão relacionadas à resposta efetora dos macrófagos infectados.

Dessa maneira, a correlação entre as alterações na resposta imune com modificações epigenéticas pode levar à identificação de possíveis biomarcadores, os quais servirão como alvos terapêuticos ou da ação imunomoduladora da função dos monócitos e macrófagos em indivíduos infectados pelo bacilo. A elucidação de tais mecanismos tornaria possível o desenvolvimento de agonistas e antagonistas das enzimas responsáveis pelas alterações na expressão gênica, de modo a promover o controle da atividade destas células e assim, favorecer a resposta imune do hospedeiro frente à infecção.

2.OBJETIVO

A partir do sangue periférico obtido de indivíduos com tuberculose latente e ativa, estabelecer uma correlação entre a resposta imune e os aspectos clínicos dos indivíduos e como estes fatores são modulados por alterações epigenéticas.

3.DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental desenvolvido no estudo.

O trabalho foi delineado a partir de três grupos de estudo: controles não infectados, indivíduos com infecção latente e pacientes com tuberculose ativa. A partir de sangue periférico, foi coletado plasma para quantificação de citocinas, sCD163 e sCD14. Ainda, monócitos foram purificados para avaliação da ativação imune através da quantificação de citocinas e espécies reativas de oxigênio mediante estimulação *in vitro* com Mtb inativado por calor, bem como PCR array para detectar expressão de enzimas de repressão ou ativação epigenética entre os grupos. Os monócitos ainda foram utilizados para avaliação da metilação global do DNA genômico como parte das análises de modulação epigenética. Os pacientes com a doença ativa foram ainda classificados de acordo com a lesão pulmonar desenvolvida através de análises de exames de raio X.

4.CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Para realização do presente trabalho, foram recrutados 17 pacientes com tuberculose ativa, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos e com tempo de tratamento inferior a 30 dias, atendidos nas Unidades de Moléstias Infecciosas (MIN) e Pneumologia Adulta (PNE) do HC da FMRP-USP e também nas unidades Básicas de Saúde do Município de Ribeirão Preto, Centro de Saúde Escola (CSE) e Unidade Básica de Saúde (UBDS) Vila Virgínia. Todos os indivíduos foram abordados no momento da consulta clínica de rotina e convidados a participar voluntariamente do estudo, e os que consentiram, registraram sua autorização através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo HCRP nº 6481/2013 – ANEXO I). A doença ativa foi diagnosticada através de sinais clínicos ou radiológicos confirmados por resultados microbiológicos. Os sinais clínicos incluem tosse, febre, expectoração, sudorese noturna, perda de peso e dor torácica com duração de 4 semanas ou mais.

Para integrar o grupo controle, 16 indivíduos previamente hígidos foram convidados a participar do estudo. Os indivíduos, que consentiram em participar, realizaram o teste cutâneo do PPD, sendo incluídos ao grupo de indivíduos não infectados aqueles cujo teste cutâneo apresentou resultado negativo (PPD-). Foram recrutados ainda 14 indivíduos saudáveis que apresentavam infecção latente pelo *Mtb*, caracterizados por teste cutâneo positivo (PPD+) e ausência de história prévia de TB ativa. Ambos grupos correspondem a voluntários recrutados no próprio hospital, como funcionários ou acompanhantes de pacientes ou voluntários de fora do hospital que regularmente procuram o serviço de saúde para realizar o teste ou a população em geral. A autorização foi registrada através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXOS I e II). Foi vetada a participação de indivíduos menores de 18 anos e de indivíduos com sorologia positiva para HIV, seja entre o grupo controle ou entre os pacientes supracitados, além daqueles que não consentiram a sua inclusão no estudo.

Tabela 1. Perfil dos grupos incluídos no estudo

Grupo	N	Idade (média)	Gênero (H/M)	Tempo de tratamento (média)
Controle	16	27	3/13	-
TB latente	14	31,4	3/11	-
TB ativa	17	39,6	14/3	14,7 d

Características gerais dos grupos envolvidos no trabalho, evidenciando o número de indivíduos por grupo (n), as médias de idade, gênero (H, homem; M, mulher) e a média de tempo de tratamento para os pacientes com TB ativa

4.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCS)

Todos os indivíduos participantes doaram 40 mL de sangue total através de punção venosa em tubos contendo Heparina (Vacutainer®; Becton, Dickinson and Company). As amostras de sangue coletadas foram diluídas em tampão fosfato (PBS) (1:2), pH 7,4 e aplicadas cuidadosamente sobre o Ficoll-Paque™ PLUS, d=1,078 g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Logo após, foram centrifugadas a 600 g por 30 minutos, à temperatura ambiente para separação da camada de células mononucleares. As células presentes na interfase do gradiente de separação foram cuidadosamente coletadas, transferidas para um novo tubo e lavadas duas vezes em PBS para obtenção do precipitado celular. Em seguida, as células mononucleares isoladas na etapa anterior foram purificados por seleção imunomagnética positiva com kit específico (Milty Biotec, Auburn, CA, USA). Com auxílio desta ferramenta, as células da fração mononuclear foram adicionadas à *beads* magnéticas complexadas a anticorpos monoclonais anti-CD14 e a solução foi aplicada à coluna de separação magnética. Após eluição das células aderidas à coluna, apenas os monócitos (fração CD14+) foram obtidos para realização dos demais experimentos. A eficiência da purificação de monócitos após separação imunomagnética foi confirmada por citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-CD14 (PerCP, Clone M5E2; BD Biosciences). Em todos os ensaios, a concentração de células CD14+ foi superior à 98% da população total de células isoladas (ANEXO IV).

4.3 Avaliação da ativação de monócitos *in vitro*

Dos monócitos isolados através de protocolo de separação magnética (4.1), uma parte foi plaqueada em placas de 96 poços para realização da quantificação de citocinas e quimiocinas a partir do sobrenadante de cultura. Para tanto, foram adicionadas 1×10^5 células por poço as quais ficaram em cultura durante 2 horas à 37 °C e 5% de CO₂ para aderência à placa de cultura. Passadas as 2 horas, as células foram estimuladas com Mtb inativado por calor (121 °C, 30 min) na razão de 5:1 (bactérias:células). As células foram novamente incubadas à 37 °C e 5% de CO₂ durante 24h e após este período o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas produzidas.

4.4 Determinação de espécies reativas de oxigênio (ros)

A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada através de ensaio de Quimiluminescência. Após protocolo de isolamento, 3×10^5 monócitos de cada indivíduo foram separados em 3 tubos de vidro, sendo 1×10^5 células por tubo. No primeiro tubo, sem adição de nenhum tipo de estímulo, foi avaliada a liberação espontânea de ROS, no segundo tubo, avaliou-se a produção mediante estimulação com Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA – Sigma Aldrich) e finalmente, no terceiro tubo foi adicionado Mtb inativado por calor (121 °C, 30 min) na razão de 5:1.

A detecção da liberação de ROS foi realizada através da utilização de Luminol (Sigma Aldrich), o qual reage com as espécies reativas de oxigênio geradas pelas células e acarreta a excitação de elétrons, permitindo assim, a detecção da quimioluminescência através da formação de fótons. A leitura da quimioluminescência foi realizada em luminômetro (AutoLumat LB 953 Multi-Tube Luminometer from Berthold) no Laboratório de Imunologia e Citologia dos Fluídos Biológicos da FCFRP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado.

4.5 Ensaio para detecção de citocinas e quimiocinas em amostras de plasma e sobrenadante de cultura celular

As citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- α 2, TNF- α , IFN- γ , IP-10, RANTES, MCP-1, GM-CSF, IL-17, MIP-1 α e MIP-1 β) presentes nas amostras de plasma e sobrenadante das células em cultura foram quantificadas utilizando uma plataforma multiplex (MILLIPLEX MAP magnetic bead-based multi-analyte panels, Merck Millipore®) analisada em leitor de placas próprio (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 específicos para as citocinas listadas, realizou-se 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.

4.6 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, através de ensaio imunoenzimático (ELISA - R&D Systems, Minneapolis, EUA). Para tal, 100 μ L/poço do anticorpo de captura anti-CD163 e anti-CD14 humano (2 μ g/mL) foram adicionados às respectivas placas de 96 poços e as placas incubadas overnight à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20, 100 μ L de cada amostra (diluídas a 1:100 em PBS pH 7,2) ou a curva padrão contendo concentrações conhecidas de sCD163 e de sCD14 foram adicionados às placas, que passaram por outra incubação durante 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 e lavagem das placas com PBS contendo 0,05% de Tween 20, 100 μ L de estreptoavidina-HRP foram adicionados em cada poço. As placas foram lavadas novamente, e a revelação da reação foi realizada com adição de substrato (H₂O₂ e TMB 1:1) por 20 minutos. A reação foi então interrompida pela adição de 2N H₂SO₄. A absorbância das amostras e curva padrão foram lidas em

espectrofotômetro 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.

4.7 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 duplo-cego, de acordo com a extensão da doença evidenciada através de exames radiológicos (Raio-X e Tomografia Computadorizada) obtidos nos respectivos centros de saúde onde foram realizadas as coletas. A doença foi considerada mínima (estágio 1), moderada (estágio 2) e avançada (estágio 3) segundo critérios descritos por Abakay O. e colaboradores [107].

Desse modo, as lesões foram consideradas mínimas (estágio 1), quando não houve evidência de cavitação e a densidade foi classificada como ligeira ou moderada, e localizada acima da segunda junção condroesternal. Além disso, tais lesões só envolviam 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 (estágio 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, o diâmetro total de cavitação não excedeu 4 cm em pacientes classificados neste estágio.

Para a classificação do paciente em doença avançada (estágio 3), considerou-se sempre que as lesões encontradas fossem de extensão maior do que a da doença moderada.

4.8 Extração de RNA total dos monócitos e síntese de cDNA

Os monócitos CD14+ isolados do sangue periférico foram lavados duas vezes com PBS e o precipitado celular foi armazenado a -80 °C até o momento da extração de RNA mensageiro. Para esta etapa, após descongelamento à 4 °C, 750 μ L de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 250 μ L de PBS foram adicionados à cada amostra, seguido da adição de 200 μ L de clorofórmio e 10 μ L de glicogênio e de leve agitação por inversão. As amostras foram centrifugadas a 14000 g, 4 °C por 15

minutos e o RNA foi recuperado da fase aquosa através da precipitação com álcool isopropílico. As amostras foram incubadas por período de 2 h a -80 °C e então centrifugadas à 14000 g, 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e para melhor obtenção do RNA, 200 µL de clorofórmio e 500 µL de álcool isopropílico foram adicionados e as amostras submetidas a nova centrifugação. O RNAm obtido foi lavado uma vez em etanol 70% centrifugando à 14000 g, 4 °C, por 15 minutos e ressuspensionado em água livre de endonucleases.

Após extração, o RNAm foi submetido a tratamento com DNase pelo kit TURBO DNA-free (Ambion, Carlsbad, EUA). O material obtido foi quantificado através da adição de 1 µL da amostra a 199 µL de solução contendo uma sonda fluorescente do Kit Qubit (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e a leitura realizada através da detecção de fluorescência pelo fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Para realização de PCR em tempo real cada 1080 ng de RNAm foram convertidos em cDNA por meio de kit cDNA High Capacity Archive (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para tanto, o RNAm foi incubado com 3 µL de tampão 10X fornecido, 1,2 µL de dNTP mixture, 3 µL de random primers 10X e 1,5 µL da enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/ µL), acrescidos de água livre de endonucleases para um volume de reação de 30 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.

4.9 Análise da expressão de enzimas de repressão epigenética

A expressão de enzimas epigenéticas relacionadas à repressão gênica foi determinada por meio de PCR em tempo real. Utilizamos TaqMan® Array 96-Well Fast Plate StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA) customizado, sendo analisadas as seguintes enzimas envolvidas na repressão da transcrição gênica: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, MBD2, MBD3 e MECP2. A reação de amplificação foi construída através da adição de 30 ng de cDNA por poço da placa acrescida de água livre de endonucleases para completar o volume de 10 µL e igual volume de TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA) foi adicionado por poço. A reação de PCR foi realizada em volume final de 20 µL e em equipamento StepOnePlus™ (Applied

Biosystems, Foster City, EUA), sendo as condições de amplificação: 20 segundos à 95 °C, seguido de 40 ciclos de 3 segundos à 95 °C e 30 segundos à 60 °C. A normalização foi realizada através da expressão de genes constitutivos: *Gapdh*, *18S*, *Hprt1*, *Gusb*, *Actb* e *B2m*.

4.10 Análise da expressão de enzimas de ativação epigenética

A expressão de enzimas epigenéticas relacionadas à ativação gênica foi determinada por meio de PCR em tempo real. Utilizamos RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, Venlo, Netherlands) customizado, sendo analisadas as seguintes enzimas envolvidas na ativação da transcrição gênica: ATF2, HAT1, KAT2B, KAT5, CARM1, PRMT5, SMYD3, SUV39H1, ASH1L, KMT2C, KMT2E, SETD1B, KDM5B, KDM6B. A reação de amplificação foi construída através da adição de 30 ng de cDNA por poço da placa acrescida de água livre de endonucleases para completar o volume de 12,5 µL e igual volume de 2X RT² SYBR Green Mastermix (QIAGEN, Venlo, Netherlands) foi adicionado por poço. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL e em equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA), sendo as condições de amplificação: 10 segundos à 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos à 95 °C e 60 segundos à 60 °C. A normalização foi realizada através da expressão de genes constitutivos: *Gapdh* e *Actb*.

4.11 Extração de DNA genômico

Os monócitos CD14+ isolados do sangue periférico foram lavados duas vezes com PBS e o precipitado celular foi armazenado a -80 °C até o momento da extração do DNA. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o “PureLink Genomic DNA kit” (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA). Para tal, foi adicionado ao precipitado 200 µL de PBS 1X, 20 µL de RNase, 20 µL de Proteinase K e 200 µL de PureLink Genomic Lysis Binding Buffer (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA) e as amostras foram incubadas a 55 °C por 10 minutos. Após este período, 200 µL de etanol 100% foi adicionado ao lisado e prosseguiu-se para etapa de ligação do DNA. O volume de amostra (640 µL) foi adicionado a colunas de extração do kit e centrifugado a 10000 g, 1 min a temperatura ambiente. O DNA aderido à

coluna foi lavado duas vezes com 500 μ L de tampão de lavagem específico do kit, seguido de centrifugação a 10000 *g* por 1 min a temperatura ambiente. Após tais lavagens, o DNA foi eluído com 50 μ L de tampão de eluição e armazenado a -20 °C para posteriores análises.

4.12 Determinação do padrão metilação global do DNA

Para determinação do padrão de metilação foram empregadas 50 ng da amostra de DNA genômico de cada indivíduo para quantificação do perfil de metilação global relativa utilizando-se o “Imprint Methylated DNA Quantification kit” (Sigma-Aldrich). A concentração de DNA foi diluída em DNA *Binding Solution* em um volume final de 30 μ L por poço e a placa foi incubada a 37 °C por 1 hora. Após período, foi adicionado 150 μ L de Solução de bloqueio a cada poço, e a placa foi novamente incubada a 37 °C por 1 h, seguida de lavagem com solução do kit (Wash Buffer 1X). Foram adicionados 50 μ L de anticorpo de captura (1:1000). Após incubação de 1 h a temperatura ambiente, a placa foi lavada e 50 μ L do anticorpo de detecção (1:1000) foram adicionados, seguido de incubação a temperatura ambiente por 30 min. Após tal período a placa foi novamente lavada, e 100 μ L de *Developing Buffer* foram adicionados por poço, seguidos de mais 10 min de incubação. A reação foi então interrompida pela adição de solução de parada do Kit e a absorbância das amostras lidas em espectrofotômetro de placa a 450 nm (μ Quant, Biotek Instruments Inc). Para determinação da porcentagem relativa de metilação do DNA utilizou-se como referência controle positivo 100% metilado, fornecido pelo kit.

4.13 Análise estatísticas

Todas as análises foram realizadas com auxílio de programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os dados de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e marcadores de ativação foram analisados por meio de teste não paramétrico Mann Whitney. As correlações entre os dados foram realizadas por meio de teste de correlação de Spearman. As correlações significativas que representam as interações entre os marcadores testados, foram compiladas através de *software Cytoscape* (versão 3.2.0 <http://www.cytoscape.org>). As redes foram

construídas para cada grupo de estudo, e o coeficiente de correlação (r) foi utilizado para categorizar a interação em negativa ($r < 0$), fraca ($r \leq 0,35$), moderada ($0,36 \leq r \leq 0,67$) e forte ($r \geq 0,68$). Para todos os testes foram considerados significativos valores de p menor ou igual a 0,05.

Para análise de bioassinatura das citocinas presentes no plasma, inicialmente, todos os dados foram utilizados para o cálculo da mediana global de cada citocina, 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 dados foram organizados em 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.

5.RESULTADOS

5.1. Aumento de correlações entre as citocinas/quimiocinas plasmáticas indicam maior grau de ativação imune nos pacientes com doença ativa.

Na progressão de doenças infecciosas, o perfil de ativação do sistema imune e consequentemente, da liberação de citocinas, tanto de forma sistêmica quanto no sítio da infecção, determinam parte dos eventos decorrentes da patologia. Durante a tuberculose, citocinas e quimiocinas desempenham papel importante na resposta imune contra o bacilo, tanto na contenção quanto na disseminação do microrganismo. Para determinar a produção de alguns destes mediadores em diferentes estágios da infecção, os níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- α 2, TNF- α , IFN- γ , IP-10, RANTES, MCP-1, GM-CSF, IL-17A, MIP-1 α e MIP-1 β foram dosados (Figura 1). Observou-se que GM-CSF, IL-12, IL-5, IL-6, IP-10 e TNF- α estavam aumentados no plasma de pacientes com doença ativa.

Destas citocinas, IL-12 apresentou-se elevada nos pacientes com tuberculose quando comparados à produção por indivíduos controle não infectados (Fig. 1D) e GM-CSF demonstrou-se aumentado nos pacientes em relação ao grupo latente (Fig. 1M), enquanto IL-5, IL-6, IP-10 e TNF- α mostraram-se aumentados quando comparado aos controles e aos indivíduos com infecção latente simultaneamente (Fig. 1G, 1H, 1I e 1K). A quimiocina RANTES, por sua vez, apresentou-se elevada nos indivíduos com infecção latente em comparação ao grupo controle e tuberculose ativa (Fig. 1L).

Figura 2. Quantificação de citocinas e quimiocinas no plasma de indivíduos controle, indivíduos com infecção latente e pacientes com tuberculose. O plasma foi separado através de centrifugação de sangue total e as quimiocinas e citocinas foram dosadas através de kit customizado MILLIPLEX® MAP human Cytokine/Chemokine; Millipore®. Cada ponto representa um indivíduo. Os resultados, expressos em pg/mL, foram analisados através de teste não paramétrico Mann Whitney.

Podemos também interpretar os dados acima de forma a estabelecer como as diferentes variáveis comportam-se no sistema. Para tanto são utilizados testes estatísticos de correlação, que é a medida do grau de ligação entre duas variáveis. Tal análise permite compreender a maneira como estes mediadores se relacionam durante o processo infeccioso e assim conseguir entender a dinâmica da resposta imune nos diferentes estágios da infecção. Sabemos que a atividade de tais analitos pode ocorrer em efeito cascata, no qual uma citocina é capaz de modular a síntese e a ação de uma segunda. As correlações podem ser positivas, quando o aumento de um dos mediadores é acompanhado do aumento de um segundo, ou negativas, quando o aumento de uma citocina acarreta redução da outra. Dessa forma, entender como ocorre a correlação entre as mesmas é uma ferramenta de análise importante, principalmente quando nos referimos a processos inflamatórios complexos como a tuberculose.

As tabela 2, 3, 4 apresentam respectivamente, os coeficientes de correlação estabelecidos entre as citocinas nos grupos Controle, TB Latente e TB Ativa. Como pode-se observar na tabela 2 as células marcadas em azul são aquelas correlações formadas no grupo Controle. São elas, GM-CSF com IFN- α 2, IL-10 e IL-4, IFN- α 2 com IL-12, IL-4 e IL-5, IFN- γ com IL-12, IL-10 com IL-4, IL-5 e IL-6, IL-12 com MIP-1 α e MIP-1 β , IL-17 com MCP-1, IL-4 com IL-1 β e IL-6, IL-6 com MIP-1 α e MIP-1 β , e por sua vez, MIP-1 α com MIP-1 β .

Na tabela 3, observamos em azul que a relações de GM-CSF com IL-10, IFN- α 2 com IL-4, IFN- γ com IL-12, IL-10 com IL-4, IL-5 e IL-6, IL-12 com MIP-1 α , IL-4 com IL-1 β e IL-6 observadas no grupo controle se mantiveram no grupo TB Latente. Entretanto, marcado em vermelho estão todas as relações que estavam presentes na condição basal do grupo controle, mas que foram perdidas uma vez que o paciente apresenta TB Latente, as quais cita-se: GM-CSF com IFN- α 2 e IL-4, IFN- α 2 com IL-12 e IL-6, IL-12 com MIP-1 β , IL-6 com MIP-1 α e MIP-1 β e MIP-1 α com MIP-1 β . Ainda, novas correlações apresentaram-se na Tabela 2, quais sejam, GM-CSF com IL-1 β , IFN- α 2 com IL-10 e IL-1 β , IFN- γ com IL-17 e MIP-1 α , IL-10 com IL-12, IL-1 β e MIP-1 α , IL-12 com IL-17, IL-1 β , IL-4, IL-5 e IL-6, IL-17 com IL-1 β , IL-5, IL-6, MCP-1 e MIP-1 α , MIP-1 α com IL-1 β e IL-4, IL-5 com IL-6 e MIP-1 β , IL-10 com IL-6 e MCP-1 e TNF- α com MCP-1 e RANTES.

Na tabela 4 estão demonstradas as correlações formadas entre as citocinas e quimiocinas nos pacientes com tuberculose ativa. Observamos que foram mantidas,

em relação ao controle, as correlações estabelecidas entre GM-CSF com IFN- α 2 e IL-4, IFN- α 2 com IL-12 e IL-4, IFN- γ com IL-12, IL-10 com IL-4 e IL-6, IL-12 com MIP-1 α e MIP-1 β , e IL-4 com IL-1 β e IL-6, marcadas em azul. Uma vez que analisamos a dinâmica da interação entre as citocinas nos indivíduos doentes algumas correlações foram perdidas, como GM-CSF e IL-10, IFN- α 2 com IL-6, IL-10 com IL-5, IL-17 com MCP-1, IL-6 com MIP- α e MIP-1 β e MIP-1 α com MIP-1 β as quais estão representadas em vermelho na tabela. E a formação de novas correlações, em verde, que foram GM-CSF com IFN- γ , IL-12, IL-1 β e MIP-1 β , IFN- α 2 com IL-1 β , MIP-1 α , MIP-1 β e TNF- α , IFN- γ com IL-10, IL-17, IL-1 β , IL-4, IL-6, IP-10, MCP-1 e TNF- α , IL-10 com IL-12, IL-17, IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β e TNF- α , IL-12 com IL-17, IL-1 β , IL-4 e TNF- α , IL-17 com IL-1 β , IL-4, IL-6 e TNF- α , IL-1 β com IL-6 e MIP-1 α , IL-4 com IL-5, MIP-1 α e MIP-1 β , IL-5 com IP-10 e MCP-1, IL-6 com IP-10, MCP-1 e TNF- α , IP-10 com MCP-1 e TNF- α e por fim, TNF- α também correlacionou-se com MCP-1.

Na tabela 5 estão demonstradas as correlações formadas entre as citocinas nos pacientes com a doença ativa em relação aos indivíduos com infecção latente. As correlações indicadas em amarelo correspondem àquelas mantidas em relação ao grupo Latente, dentre as quais encontraram-se GM-CSF com IFN- α 2 e IL-1 β , IFN- α 2 com IL-4, IFN- γ com IL-12 e IL-17, IL-10 com IL-12, IL-1 β , IL-4, IL-6 e MIP-1 α , IL-12 com IL-17, IL-1 β e MIP-1 α , IL-17 com IL-1 β e IL-6, IL-1 β com IL-6 e MIP-1 α , IL-4 com IL-6 e MIP-1 α , IL-6 com IP-10, que por sua vez correlaciona-se com MCP-1, que está correlacionado com TNF- α . Foram perdidas algumas das correlações como GM-CSF e IFN- α 2 com IL-10, IFN- γ com MIP-1 α , IL-10 com IL-5, IL-12 com IL-5, IL-6 e IP-10, IL-17 com IL-5, MCP-1 e MIP-1 α , IL-5 com IL-6 e MIP-1 β e RANTES com TNF- α representadas em vermelho, bem como podemos observar o estabelecimento de novas correlações, em verde, dentre as quais GM-CSF com IFN- γ , IL-12, IL-4 e MIP-1 β , IFN- α 2 com IL-12, IL-1 β , MIP-1 α , MIP-1 β e TNF- α , IFN- γ com IL-10, IL-1 β , IL-4, IL-6, IP-10, MCP-1 e TNF- α , IL-10 com IL-17, MCP-1, MIP-1 β TNF- α , IL-12 com IL-4, MIP-1 β e TNF- α , IL-17 com IL-4 e TNF- α , IL-1 β com IL-6, IL-4 com IL-5 e MIP-1 β , IL-5 com IP-10 e MCP-1, IL-6 com MCP-1 e TNF- α e por fim, TNF- α com IP-10.

As correlações estabelecidas foram ainda analisadas através de software Cytoscape para estabelecimento de redes, como demonstrado na Figura 3, em que estão representadas as interações entre as citocinas e quimiocinas no plasma de

indivíduos controle, com infecção latente e com tuberculose ativa. Tais interações foram ainda classificadas de acordo com a intensidade da correlação determinada através do valor do coeficiente de relação (r) em forte, moderada, fraca e negativa.

Tabela 2. Correlações estabelecidas ente citocinas/quimiocinas plasmáticas de indivíduos Controle. Todas as citocinas avaliadas no plasma foram analisadas quanto a propriedade de correlacionarem-se entre si.

CONTROLE	GM-CSF	IFN- α 2	IFN- γ	IL-10	IL-12 p70	IL17A	IL- 1 β	IL-4	IL-5	IL-6	IP-10	MCP-1	MIP-1 α	MIP-1 β	RANTES	TNF- α
GM-CSF																
IFN- α 2	0,7043															
IFN- γ	-0,06402	0,4664														
IL-10	0,7356	0,4283	0,2212													
IL-12 p70	0,2073	0,6019	0,7047	0												
IL17A	-0,2492	0,1702	0,5471	-0,2606	0,5836											
IL- 1 β	0,1341	0,285	0,4679	0,2399	0,3833	0,07903										
IL-4	0,6708	0,7622	0,302	0,583	0,3437	0,06749	0,5672									
IL-5	0,625	0,3292	0,1712	0,7196	0,1684	-0,5167	-0,08689	0,2659								
IL-6	0,2866	0,6443	0,3705	0,6107	0,3346	0,1155	0,4485	0,8287	0,2901							
IP-10	0,09726	-0,282	-0,2362	0,3576	-0,4247	-0,1515	-0,3483	-0,1713	0,3579	0,03608						
MCP-1	-0,2409	0,2218	0,2999	0,07217	0,1996	0,6444	0,07885	0,2993	-0,3043	0,4775	-0,02358					
MIP-1 α	0,4862	0,5566	0,4434	0,4573	0,6636	0,006098	-0,07951	0,3766	0,5474	0,6942	0,1402	0,5076				
MIP-1 β	0,2796	0,5654	0,5714	0,07879	0,766	0,1758	-0,2979	0,2025	0,2553	0,7112	0,1758	0,5167	0,8049			
RANTES	0,5396	0,2817	-0,06061	0,1312	0,1494	-0,3647	0,2382	0,2855	0,03466	0,2198	0,02802	-0,2517	-0,0948	-0,01216		
TNF- α	-0,3587	0,1944	0,4546	0,4238	0,2038	0,1758	0,1384	0,1551	0,2747	0,3932	-0,08542	0,325	0,25	0,297	-0,3732	

Em azul estão representadas as correlações estabelecidas entre citocinas no grupo controle. As correlações foram realizadas através de teste estatístico de Sperman, sendo consideradas apenas aquelas com $p < 0,05$

Tabela 3. Correlações estabelecidas ente citocinas/quimiocinas plasmáticas de indivíduos TB Latente. Todas as citocinas avaliadas no plasma foram analisadas quanto a propriedade de correlacionarem-se entre si.

LATENTE	GM-CSF	IFN- α 2	IFN- γ	IL-10	IL-12 p70	IL17A	IL- 1 β	IL-4	IL-5	IL-6	IP-10	MCP-1	MIP-1 α	MIP-1 β	RANTES	TNF- α
GM-CSF																
IFN- α 2	0,5094															
IFN- γ	0,2837	0,2077														
IL-10	0,632	0,6969	0,3506													
IL-12 p70	0,524	0,4452	0,5697	0,7065												
IL17A	0,394	0,4044	0,9141	0,5105	0,582											
IL- 1 β	0,5557	0,7086	0,5193	0,8612	0,5791	0,5677										
IL-4	0,4939	0,8049	0,3094	0,781	0,4631	0,4309	0,7837									
IL-5	0,5279	0,3211	0,4556	0,5473	0,7852	0,5511	0,3618	0,379								
IL-6	0,295	0,531	0,484	0,606	0,8527	0,5436	0,5	0,6372	0,7186							
IP-10	0,0232	0,3142	0,2282	0,1954	0,5681	0,129	0,1476	0,2035	0,4105	0,6313						
MCP-1	0,02099	0,2854	0,01213	0,2594	0,5212	-0,07497	0,2291	0,1571	0,1724	0,4724	0,7296					
MIP-1 α	0,5221	0,4906	0,6476	0,71	0,6411	0,5903	0,8361	0,6608	0,35	0,527	0,1202	0,2095				
MIP-1 β	0,2404	-0,08168	0,418	0,04405	0,4878	0,2992	-0,00659	-0,245	0,5483	0,2379	0,5176	0,09031	0,11			
RANTES	0,5022	0,02886	0,01438	0,06645	0,1265	-0,00221	0,04199	-0,1398	0,231	-0,1074	0,3112	0,2857	-0,02655	0,4199		
TNF- α	0,4084	0,3912	0,04956	0,3771	0,3434	0,163	0,2772	0,2343	0,2556	0,2304	0,3032	0,6472	0,1949	-0,09021	0,6184	

Em azul estão representadas as correlações mantidas em relação ao grupo controle. Em verde novas correlações formadas e em vermelho correlações perdidas no grupo experimental em relação ao grupo controle. As correlações foram realizadas através de teste estatístico de Sperman, sendo consideradas apenas aquelas com $p < 0,05$.

Tabela 4. Correlações estabelecidas ente citocinas/quimiocinas plasmáticas de indivíduos TB Ativa. Todas as citocinas avaliadas no plasma foram analisadas quanto a propriedade de correlacionarem-se entre si.

TB ATIVA	GM-CSF	IFN- α 2	IFN- γ	IL-10	IL-12 p70	IL17A	IL- 1 β	IL-4	IL-5	IL-6	IP-10	MCP-1	MIP-1 α	MIP-1 β	RANTES	TNF- α
GM-CSF																
IFN- α 2	0,6021															
IFN- γ	0,5572	0,3481														
IL-10	0,3539	0,3781	0,59													
IL-12 p70	0,6115	0,5709	0,5372	0,4822												
IL17A	0,4562	0,3917	0,9195	0,6586	0,5175											
IL- 1 β	0,6955	0,6055	0,7094	0,5827	0,5204	0,7379										
IL-4	0,7401	0,6891	0,6337	0,5252	0,7829	0,5977	0,8543									
IL-5	0,01794	0,2489	0,4022	0,2782	0,4197	0,3552	0,3681	0,4923								
IL-6	0,1805	0,2719	0,7436	0,5083	0,3855	0,6023	0,5829	0,6102	0,4595							
IP-10	-0,237	-0,1155	0,5298	0,2789	0,07371	0,466	0,008631	0,03071	0,5728	0,5297						
MCP-1	-0,2256	0,007459	0,4853	0,5028	0,1377	0,3966	0,2554	0,287	0,5633	0,7313	0,7213					
MIP-1 α	0,4159	0,5183	0,4678	0,6425	0,6204	0,5098	0,6415	0,6505	0,2888	0,2288	-0,02594	0,2525				
MIP-1 β	0,5233	0,5447	0,3542	0,6909	0,7556	0,424	0,4027	0,5941	0,2906	0,1859	0,03131	-0,02328	0,4356			
RANTES	0,03044	0,02799	-0,1832	0,1052	0,0572	-0,2829	0,08765	0,1255	0,2818	-0,2357	-0,2819	-0,0842	0,3518	-0,03402		
TNF- α	-0,05541	0,4932	0,5568	0,5528	0,5061	0,6184	0,3453	0,3993	0,4548	0,6009	0,5767	0,5003	0,361	0,4307	-0,2623	

Em azul estão representadas as correlações mantidas em relação ao grupo controle. Em verde novas correlações formadas e em vermelho correlações perdidas no grupo experimental em relação ao grupo controle. As correlações foram realizadas através de teste estatístico de Sperman, sendo consideradas apenas aquelas com $p < 0,05$

Tabela 5. Correlações estabelecidas ente citocinas/quimiocinas plasmáticas de indivíduos TB Ativa em relação aos indivíduos com infecção latente. Todas as citocinas avaliadas no plasma foram analisadas quanto a propriedade de correlacionarem-se entre si.

TB ATIVA	GM-CSF	IFN- α 2	IFN- γ	IL-10	IL-12 p70	IL17A	IL- 1 β	IL-4	IL-5	IL-6	IP-10	MCP-1	MIP-1 α	MIP-1 β	RANTES	TNF- α
GM-CSF																
IFN- α 2	0,6021															
IFN- γ	0,5572	0,3481														
IL-10	0,3539	0,3781	0,59													
IL-12 p70	0,6115	0,5709	0,5372	0,4822												
IL17A	0,4562	0,3917	0,9195	0,6586	0,5175											
IL- 1 β	0,6955	0,6055	0,7094	0,5827	0,5204	0,7379										
IL-4	0,7401	0,6891	0,6337	0,5252	0,7829	0,5977	0,8543									
IL-5	0,01794	0,2489	0,4022	0,2782	0,4197	0,3552	0,3681	0,4923								
IL-6	0,1805	0,2719	0,7436	0,5083	0,3855	0,6023	0,5829	0,6102	0,4595							
IP-10	-0,237	-0,1155	0,5298	0,2789	0,07371	0,466	0,008631	0,03071	0,5728	0,5297						
MCP-1	-0,2256	0,007459	0,4853	0,5028	0,1377	0,3966	0,2554	0,287	0,5633	0,7313	0,7213					
MIP-1 α	0,4159	0,5183	0,4678	0,6425	0,6204	0,5098	0,6415	0,6505	0,2888	0,2288	-0,02594	0,2525				
MIP-1 β	0,5233	0,5447	0,3542	0,6909	0,7556	0,424	0,4027	0,5941	0,2906	0,1859	0,03131	-0,02328	0,4356			
RANTES	0,03044	0,02799	-0,1832	0,1052	0,0572	-0,2829	0,08765	0,1255	0,2818	-0,2357	-0,2819	-0,0842	0,3518	-0,03402		
TNF- α	-0,05541	0,4932	0,5568	0,5528	0,5061	0,6184	0,3453	0,3993	0,4548	0,6009	0,5767	0,5003	0,361	0,4307	-0,2623	

Em amarelo estão representadas as correlações mantidas em relação ao grupo TB Latente. Em verde novas correlações formadas e em vermelho correlações perdidas no grupo experimental em relação ao grupo de indivíduos com infecção latente. As correlações foram realizadas através de teste estatístico de Sperman, sendo consideradas apenas aquelas com $p < 0,05$

Figura 3. Rede de Interação entre as citocinas plasmáticas. Redes foram organizadas para compreensão das interações entre as citocinas detectadas no plasma de indivíduos controle, latente e com doença ativa. As correlações significativas, com valor de $p < 0,05$, estão representadas por traços de acordo com a intensidade da associação, sendo classificadas em fraca, moderada, forte e negativa.

5.2. Marcadores de ativação de monócitos e macrófagos estão aumentados em pacientes com doença ativa

Visto a mudança no padrão de correlações estabelecidas entre as citocinas e quimiocinas plasmáticas de pacientes com tuberculose ativa ou latente, inferimos que as células do sistema imune inato dos pacientes poderiam apresentar modulação no seu estado de ativação. Assim, analisamos a ativação de monócitos, visto que são células inatas importantes na resposta contra o bacilo, sendo recrutadas para o sítio infeccioso onde darão origem aos macrófagos e células dendríticas teciduais.

Como marcadores de ativação de monócitos, avaliamos a presença de CD163 e CD14 solúveis no plasma e os resultados estão expressos nas Figuras 4 e 5 respectivamente. Pacientes com a doença ativa apresentaram no plasma níveis elevados de CD163 e CD14 solúveis quando comparados aos dois outros grupos de estudo, indicando maior resposta inflamatória e maior grau de ativação dos monócitos em relação aos indivíduos controle e com infecção latente.

Figura 4 Quantificação de níveis plasmáticos de sCD163 nos indivíduos controle, com infecção latente e pacientes com tuberculose ativa. Os níveis de CD163 solúvel foram dosados em plasma através de ELISA. Cada ponto é representativo de um indivíduo. Os resultados, expressos em ng/mL, foram analisados através de teste não paramétrico Mann Whitney.

Figura 5. Quantificação de níveis plasmáticos de sCD14 nos indivíduos controle, com infecção latente e pacientes com tuberculose ativa. Os níveis de CD14 solúvel foram dosados em plasma através de ELISA. Cada ponto é representativo de um indivíduo. Os resultados, expressos em ng/mL, foram analisados através de teste não paramétrico Mann Whitney

5.3. Frequência aumentada de indivíduos com níveis elevados de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação podem caracterizar uma Bioassinatura associada à Tuberculose pulmonar ativa

Para caracterização detalhada do perfil imunológico dos pacientes nos diferentes estágios da tuberculose em relação ao grupo controle de nosso estudo, analisamos a bioassinatura das citocinas, quimiocinas e mediadores solúveis detectados no plasma de acordo com a frequência de indivíduos caracterizados como altos produtores a partir da mediana global de cada marcador, como demonstrado na Figura 6.

Os nossos dados demonstraram que o grupo de indivíduos controle apresenta frequências inferiores a 50% para a maioria dos marcadores analisados, com exceção para IFN- γ , IL-10, IL-17, IL-1 β e MIP-1 β que obtiveram frequências de 56, 56, 70, 50 e 50% respectivamente. De maneira semelhante, o grupo latente apresentou frequências inferiores a 50%, estando acima apenas IFN- γ , IL-4, MCP-1, MIP-1 β e RANTES com frequências de 50, 50, 71, 50 e 71% respectivamente.

Porém, quando observamos os marcadores no plasma dos pacientes com a doença ativa, observou-se que a maior parte dos mesmos apresentava frequências superiores a 50%, sendo GM-CSF, IFN- α 2, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IP-10, MIP-1 α , RANTES, TNF- α , sCD163 e sCD14 com respectivas frequências de 73, 59, 59, 59, 65, 77, 77, 59, 53, 65, 82 e 88%.

A Figura 6A representa o diagrama das frequências de acordo com o marcador analisado, sendo os pontos marcados em preto aqueles correspondentes aos valores superiores à mediana global do respectivo analito, e em branco aqueles com valores inferiores. Em 6B, é representado através de gráfico de radar a dispersão dos dados expressos na Fig. 6A.

A

Figura 6. Representações da assinatura global da tuberculose pulmonar. (A) Diagramas das frequências foram projetados utilizando o valor da mediana global de cada mediador solúvel como ponto de corte para marcar cada indivíduo em "baixos" ou "altos" níveis de um determinado analito. Os pontos marcados em preto correspondem aos valores superiores à mediana global do respectivo analito, e em branco aqueles com valores inferiores à mediana. Abaixo de cada quadro estão representados a frequência (%) de indivíduos que apresentam níveis elevados dos mediadores e os dados relevantes ($\geq 50\%$) estão em formato negrito e sublinhado. (B) Os gráficos de radar resumem a assinatura dos mediadores analisados na tuberculose pulmonar, em relação aos indivíduos controle e latentes, em que cada eixo mostra a proporção de indivíduos com níveis elevados de um dado mediador. Os dados relevantes ($\geq 50\%$) estão indicados pelas setas (→)

5.4. Grau de lesão pulmonar em pacientes com tuberculose ativa correlacionam-se positivamente com níveis plasmáticos de sCD163 e TNF- α

Pacientes com tuberculose ativa analisados neste trabalho apresentaram níveis plasmáticos elevados de citocinas e de marcadores de ativação de monócitos. Dessa maneira, a próxima questão analisada foi a existência de correlações entre tais marcadores de ativação, citocinas e quimiocinas e o grau de lesão pulmonar apresentado pelos pacientes estudados. Para tal, os exames de raio X dos pacientes foram analisados e classificados em três graus, conforme extensão da lesão. Imagens representativas de cada um dos graus de classificação da lesão pulmonar nestes pacientes estão representadas na Figura 7.

O grau de lesão pulmonar foi então correlacionado com níveis plasmáticos de sCD163, sCD14, IL-6, TNF- α e IP-10, e ainda com níveis séricos de proteína C reativa (PCR), a qual já é utilizada na clínica como indicativo de infecção e inflamação aguda. Os níveis de PCR foram fornecidos pelo HCFMRP, que realiza a dosagem de tal mediador inflamatório no soro dos pacientes como rotina através de método imunoturbidimétrico com látex – kit PCR ultrasensível (Wiener lab, Rosario, Argentina).

Podemos observar que os níveis plasmáticos de sCD163 (Fig. 8A) e TNF- α (Fig. 8B) apresentaram-se positivamente correlacionados com o grau de lesão pulmonar apresentado pelos pacientes com a doença ativa, sendo que níveis elevados de tais marcadores correlacionam-se com a maior gravidade do quadro clínico nestes pacientes. Em relação aos demais mediadores dosados não foi possível identificar correlações significativas com o quadro de lesão pulmonar. Dessa forma, o aumento de sCD163 e de TNF- α no plasma dos pacientes com a doença ativa podem ser indicativos de progressão da doença.

A

B

C

Figura 7. Classificação da lesão pulmonar em pacientes com a doença ativa. A lesão pulmonar dos pacientes foi classificada segundo critérios descritos por Abakay O. e colaboradores [92] em teste duplo cego e então dividida em três graus. As imagens são representativas de cada um dos graus, sendo (A) lesão mínima ou grau 1, (B) lesão moderada ou grau 2 e (C) lesão avançada ou grau 3.

Figura 8. Correlação entre níveis plasmáticos de marcadores de ativação de monócitos, citocinas e quimiocinas com lesão pulmonar em pacientes com doença ativa. Os níveis de sCD163, sCD14, TNF- α , IP-10, IL-6 e PCR foram correlacionados com os graus de lesão pulmonar em pacientes com doença ativa através de teste estatístico de Sperman. Os valores de p e r^2 estão especificados nos gráficos. PCR=Proteína C Reativa.

5.5 Monócitos de pacientes com tuberculose ativa apresentam maior ativação imune mediante estimulação com Mtb

Uma vez que foi possível identificar o aumento na concentração plasmática de marcadores de ativação de monócitos em pacientes com a doença ativa quando comparado aos outros grupos de estudo, analisamos *in vitro* a capacidade dos monócitos produzirem citocinas e espécies reativas de oxigênio produzidas mediante estimulação em cultura com Mtb inativado por calor. Como visto na Figura 9, não houve diferença significativa quanto a produção de citocinas por estas células, porém é possível observar que os monócitos de pacientes tenderam a produzir maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6 (Fig. 9B) e TNF- α (Fig. 9C).

De acordo com a Figura 10A e B, observamos que monócitos de indivíduos controle ou infectados por TB, apresentaram a mesma capacidade em liberar espécies reativas de oxigênio (ROS), espontaneamente ou quando estimulados com PMA. Entretanto, quando é adicionado Mtb morto por calor à cultura celular, observamos que os monócitos provenientes de pacientes com tuberculose ativa apresentaram produção elevada de ROS quando comparados ao grupo controle (Fig. 10C), porém nenhuma diferença foi observada em relação ao grupo latente.

Figura 9. Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de monócitos estimulados com Mtb. Os níveis de IL-12, IL-6, TNF- α e IL-1 β foram dosados no sobrenadante de cultura de monócitos através de kit MILLIPLEX® MAP human Cytokine/Chemokine (Millipore®). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo. Os resultados, expressos em FOLD CHANGE em relação ao não estimulado, foram analisados através de teste não paramétrico Mann Whitney.

Figura 10. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por monócitos de indivíduos controle, indivíduos com infecção latente e pacientes com tuberculose. A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada através de quimioluminescência mediante estimulação com PMA e Mtb inativado por calor. Cada ponto é representativo de um indivíduo. Os resultados, expressos em área sob a curva, foram analisados através de teste não paramétrico Mann Whitney.

5.6 Pacientes com tuberculose ativa parecem apresentar alterações na expressão de enzimas responsáveis pelas modificações epigenéticas.

Visto o perfil de ativação imune apresentado pelos pacientes com tuberculose ativa, evidenciados pela elevada produção de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio somadas a detecção de níveis elevados de marcadores de ativação de monócitos e macrófagos, e que tais eventos estão intimamente relacionados a alterações na expressão gênica das células, em particular dos monócitos, buscamos entender de que maneira as alterações no perfil de modificações epigenéticas poderiam estar envolvidas neste estado de ativação celular.

Tais modificações são controladas por enzimas, que atuam através da inserção ou remoção de grupamentos químicos à estrutura do DNA, como grupamentos metil, acetil, fosfato, dentre outros e, assim, controlam a acessibilidade de fatores de transcrição e complexos enzimáticos ao promotor gênico. Dessa maneira, empregamos análises de expressão gênica para as principais classes de enzimas responsáveis pelas modificações no padrão de expressão celular, de modo a entender os processos epigenéticos desencadeados pela infecção e/ou pela inflamação gerada em resposta ao processo infeccioso.

Analizamos a expressão de enzimas de repressão gênica, dentre as quais cita-se DNA metiltransferases (DNMTs), Histona deacetilases (HDACs), e outras proteínas acessórias, como as proteínas ligadoras de ilhas CpG metiladas. Também analisamos enzimas responsáveis por modificações ativadoras, tais como DNA/Histona demetilases, Histona metiltransferases e Histona acetiltransferases, como observados nas Figuras 11 e 12 respectivamente. Desta forma, monócitos de pacientes com tuberculose ativa pareceram apresentar menor expressão de enzimas responsáveis por modificações repressoras da transcrição gênica (Fig. 11) e expressão elevada de enzimas responsáveis pela ativação gênica quando comparados aos monócitos obtidos do grupo controle (Fig. 12).

Figura 11. Expressão de enzimas de modulação epigenética relacionadas à repressão gênica. A expressão das enzimas foi realizada através de TaqMan® Array 96-Well Fast Plate StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Cada barra é representativa da mediana+desvio de cada grupo (n=3 por grupo analisado). Os dados estão demonstrados em expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em relação ao grupo controle (linha tracejada). Os resultados foram analisados através de teste não paramétrico Mann Whitney.

Figura 12. Expressão de enzimas de modulação epigenética relacionadas à ativação gênica. A expressão das enzimas foi realizada através de RT² Profiler PCR Array customizado pela Qiagen (QIAGEN, Venlo, Netherlands). Cada barra é representativa da mediana+desvio de cada grupo (n=4 por grupo analisado). Os dados estão demonstrados em expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em relação ao grupo controle (linha tracejada). Os resultados foram analisados através de teste não paramétrico Mann Whitney.

5.7 Metilação global do DNA mostrou-se reduzida em pacientes com tuberculose ativa

Como demonstrado, pacientes com tuberculose ativa tenderam a apresentar menor expressão de enzimas repressoras, como as DNA metiltransferases, responsáveis pela inserção de grupamento metil a regiões ricas em bases CG, conhecidas por ilhas de CpG, ao passo que mostraram maior expressão das enzimas responsáveis pela remoção de tais grupamento, as DNA demetilases. Visto a regulação apresentada nestes pacientes de modo a diminuir a metilação do DNA e permitir a maior acessibilidade ao DNA e a transcrição gênica, empregamos uma análise do perfil de metilação global do DNA nos monócitos destes pacientes, para então corroborarmos os achados em relação às enzimas e assim, reforçarmos a hipótese de que eventos relacionados a infecção são modulados por alterações epigenéticas na células da resposta imune à tuberculose, e que tais eventos poderiam atuar como marcadores da doença.

Assim, a partir do DNA genômico extraído foi possível avaliar a porcentagem de metilação global do DNA relativa a um controle considerado 100% metilado. Os dados obtidos mostraram que pacientes com tuberculose ativa apresentam menor porcentagem de metilação global quando comparados aos indivíduos controle e com infecção latente, como visto na Figura 13, corroborando os dados de expressão de enzimas de regulação epigenética.

Figura 13. Porcentagem de metilação global do DNA genômico em indivíduos controle, latente e pacientes com a doença ativa. A determinação da metilação global do DNA foi realizada através de "Imprinting Methylated DNA Quantification Kit" (Sigma-Aldrich®). Cada ponto é representativo de um indivíduo. Os dados estão expressos em porcentagem (%) relativa ao controle 100% metilado fornecido pelo kit. Os resultados foram analisados através de teste não paramétrico Mann Whitney.

6.DISSCUSSÃO

A resposta bem sucedida do hospedeiro a um agente patogênico requer a coordenação precisa dos componentes do sistema imune. Desta forma, o reconhecimento do patógeno por fagócitos induz ativação celular e secreção de citocinas e quimiocinas, um processo finamente regulado [108]. Dependendo do grau e tipo de resposta imune induzida, os mecanismos de proteção do hospedeiro podem ser estimulados, e se a estimulação for muito persistente ou descontrolada, pode acarretar ainda em dano tecidual [109]. Neste sentido, as citocinas desempenham importante papel no desenvolvimento e regulação da resposta imune e sua importância como marcadores dos estágios clínicos da tuberculose e/ou como marcadores da resposta a tratamento específico vem sendo demonstrada por diferentes autores [110,111].

Conhecidos os papéis desempenhados por tais mediadores, o presente estudo investigou o perfil de 16 citocinas e quimiocinas no plasma de pacientes com tuberculose ativa, indivíduos com infecção latente e indivíduos controles não infectados, como representado na Figura 2 para relacionarmos a resposta inflamatória com outros parâmetros clínicos. Das citocinas analisadas no plasma, TNF- α , IL-12, IL-5, IL-6, IP-10 e GM-CSF apresentaram níveis elevados em pacientes com tuberculose ativa. O aumento de IL-12 foi detectado entre o grupo de tuberculose ativa em relação aos indivíduos controle e o de GM-CSF em relação ao grupo latente, enquanto TNF- α , IL-5, IL-6 e IP-10 apresentaram-se elevados nos pacientes com a doença ativa, em comparação aos outros dois grupos de estudo.

No processo de controle da infecção, TNF- α desempenha papel primordial, atuando em várias células [112-114], como em macrófagos, nos quais em sinergismo com IFN- γ , atua estimulando a produção de espécies reativas de nitrogênio, e assim, pode mediar a função tuberculostática destas células [115, 116]. O TNF- α está envolvido também no recrutamento de outras células para o local de infecção, contribuindo para formação e manutenção da estrutura do granuloma, e atuando na progressão da doença [117]. O presente trabalho demonstrou que tal citocina encontrou-se aumentada no plasma de pacientes com a tuberculose ativa, corroborando dados anteriormente descritos em que observou-se aumento de TNF- α em fases iniciais da infecção no plasma, no líquido pleural e em cultura de monócitos de pacientes com tuberculose, antes ou após início de tratamento quando comparados com indivíduos na fase crônica da doença ou mesmo com indivíduos controles [110, 111, 118]. Além disso, outros estudos sugerem que os níveis de

TNF- α elevados no início da infecção diminuíram significativamente ao longo do tratamento, concomitantemente à redução do processo inflamatório [118].

A citocina IL-12 atua de maneira central na resposta imune contra o bacilo [119], direcionando o desenvolvimento do padrão Th1 como um potente indutor da produção de IFN- γ por células T e NK e assim, favorecendo mecanismos de resposta imune celular [120]. Nossos dados de que a IL-12 estava aumentada na tuberculose ativa, corroboram com Zahran e colaboradores, que mostraram que pacientes com a doença ativa apresentavam maior porcentagem de monócitos expressando IL-12 quando comparados aos controles não infectados, mas não quando comparados aos indivíduos com infecção latente [121]. Porém tais dados são controversos na literatura, visto que outros autores não detectaram nenhuma diferença quanto aos níveis séricos de IL-12 [122].

Outra citocina diferencialmente expressa entre os grupos foi a IL-6, reconhecida como uma das citocinas mais pleiotrópicas em humanos por estar envolvida na ativação de vários tipos celulares, exercendo importante papel na regulação de respostas inflamatórias [123]. Apresenta papel dual na resposta imune, e sendo assim já foi demonstrado que na resposta contra o bacilo pode atuar promovendo o crescimento intracelular do Mtb em monócitos [124], ao passo que também está envolvida de maneira importante na resistência à tuberculose [125]. Em nosso trabalho, mostramos que os níveis plasmáticos de IL-6 estavam aumentados em pacientes com tuberculose ativa, quando comparados aos indivíduos latentes, bem como aos controles não infectados, concordando com dados da literatura que mostraram o mesmo aumento em soro de pacientes [122, 126]. Portanto, em nossos dados, a IL-6 parece estar relacionada à progressão da doença.

O aumento de IL-5 no plasma destes pacientes não é ainda bem compreendido. IL-5 caracteriza-se por ser uma citocina produzida por células do padrão Th2 de resposta, estando envolvida no crescimento e diferenciação de células B [127] e no recrutamento de eosinófilos. Já foi demonstrado em modelo experimental que os eosinófilos estavam presentes no sítio de infecção por Mtb. Lasco e colaboradores demonstraram que houve grande influxo de eosinófilos para os pulmões de cobaias infectadas pela via respiratória com *M. tuberculosis* [128]. Entretanto, outras quimiocinas podem participar também do recrutamento de eosinófilos e a associação direta da IL-5 com a tuberculose ainda não está

claramente estabelecida. Por outro lado, Erb e colaboradores mostraram que tal citocina não foi fundamental para a resposta ao bacilo, visto que animais deficientes de IL-5 conseguiram controlar a infecção, bem como produzir IFN- γ [129]. Entretanto, a IL-5 parece desempenhar algum papel em condições de co-infecção, visto que dados da literatura já mostraram aumento de IL-5 em pacientes co-infectados com HIV [130, 131]. Diedrich e colaboradores evidenciaram que monócitos infectados *in vitro* com Mtb e SIV expressaram quantidades elevadas de IL-5 e IL-13 [130]. Porém, em nosso trabalho nenhum dos pacientes analisados apresentavam tal co-infecção. Não sabemos ao certo porque níveis plasmáticos de IL-5 mostraram-se alterados nos pacientes com tuberculose, podendo tal fato estar associado a outras co-infecções não descritas nos prontuários, como hepatites e helmintos, fato que poderá ser melhor investigado em nossos grupos de estudo.

IP-10 (CXCL10), que é um mediador responsável pela quimiotaxia de leucócitos para o local da infecção, relacionada ao recrutamento de linfócitos Th1 e a formação do granuloma [132], também apresentou níveis plasmáticos aumentados no presente estudo, quando foram comparados pacientes com a doença ativa e indivíduos com infecção latente e controles. Vários trabalhos sugerem o envolvimento de IP-10 na tuberculose, estando significativamente aumentado no soro e no plasma de pacientes com a doença ativa em relação a indivíduos com infecção latentes e controles [133, 134]. Também já foi descrito aumento de células positivas para IP-10 no lavado broncoalveolar de pacientes comparado aos controles [135] e ainda a expressão aumentada do RNAm de tal quimiocina no pulmão de camundongos após exposição a Mtb por aerosol [136]. Nossos dados corroboram aos apresentados nos trabalhos anteriores e reforçam o papel de IP-10 sugerido como marcador da tuberculose ativa [137]. Outros dados mostraram ainda que o aumento de IP-10 pode estar relacionado ao aumento de TNF- α . Algood e colaboradores relataram tanto em experimentos, *in vivo* quanto *in vitro*, que quimiocinas inflamatórias como RANTES, CXCL9 e IP-10 tiveram produção aumentada após infecção por Mtb em camundongos e primatas, e que esta expressão foi dependente de TNF- α , uma vez que quando esta última foi neutralizada, a expressão de quimiocinas ficou reduzida [138]. Nosso achados podem corroborar tal relação em fases iniciais da doença, uma vez que ambos mediadores estavam aumentados em nossos pacientes com a doença ativa.

Além de tais citocinas, GM-CSF também apresentou-se aumentada no plasma de pacientes com a doença ativa em relação àqueles indivíduos com infecção latente. Níveis elevados já foram descritos em pacientes com tuberculose ativa quando comparados a indivíduos controle, como demonstrado por Maertzdorf e colaboradores [139]. Tal mediador desempenha papel crucial na homeostase do tecido pulmonar, estando diretamente relacionado com a diferenciação dos macrófagos alveolares [140] e na patogênese da tuberculose apresenta-se envolvido na formação do granuloma e no desenvolvimento da imunidade mediada por células no início da infecção [141]. Gonzalez-Juarrero e colaboradores mostraram que em camundongos deficientes para GM-CSF, macrófagos alveolares e células dendríticas apresentaram falhas na fagocitose e na destruição do *M. tuberculosis*, na formação do granuloma e no desenvolvimento de resposta Th1, afetando o controle da carga bacteriana [142].

Demonstramos ainda que pacientes com infecção latente apresentaram aumento significativo de RANTES (CCL5) quando comparados com os demais grupos. Tal mediador consiste em um membro da família de β quimiocinas, e apresenta papel inflamatório, atuando no recrutamento e diferenciação de células T para o sítio infeccioso [143]. Na tuberculose, já foi demonstrado que pacientes com a doença ativa apresentavam aumento de RANTES no lavado bronco alveolar durante a fase aguda da infecção [144]. Saukkone e colaboradores mostraram que durante a infecção *in vitro* de macrófagos alveolares com cepas de Mtb, houve aumento da produção de quimiocinas, e destas, MCP-1 e RANTES apresentaram-se relacionados com a inibição do crescimento intracelular do bacilo [145]. Tal atuação de RANTES fornece suporte ao nosso achado de que pacientes com a tuberculose latente demonstraram níveis plasmáticos elevados de tal quimiocina, bem como às análises de frequência de altos produtores, nas quais o grupo latente apresentou alta frequência tanto para RANTES quanto para MCP-1, sendo ambas de 71%, sugerindo um mecanismo de controle da infecção nestes indivíduos.

Outas citocinas importantes não se mostraram diferencialmente expressas entre os grupos de estudo, como IFN- γ , IL-17, IL-4 e IL-10. Alguns autores relataram que tais citocinas estavam aumentadas no plasma de pacientes com tuberculose, como foi o caso do IFN- γ e IL-10, [122]. Entretanto em nossos estudos não detectamos aumento de IFN- γ e IL-10, os quais mantiveram-se inalteradas entre os

diferentes grupos de estudo. Já os níveis inalterados de IL-4 também foram encontrados em outros trabalhos, comprovando os dados aqui apresentados [122]. IL-17 também não apresentou nenhuma diferença entre os nossos grupos. Nossos dados corroboram Matthews e colaboradores que não evidenciaram diferenças quanto a detecção de IL-17 no plasma de indivíduos com TB pleural em relação ao grupo controle [146]. Outros autores apresentaram dados controversos, que mostraram que a frequência de células Th17 no sangue total de pacientes com a doença ativa apresentou-se reduzida [147].

A variabilidade de citocinas encontradas nos diversos trabalhos refletem que as alterações no balanço entre as citocinas estão mais relacionadas com a maneira como a infecção e a doença se desenvolvem do que com o aumento ou a redução de determinada citocina isoladamente. Visto isto, outra maneira de analisar tal quantificação foi através do estabelecimento de correlações entre os níveis plasmáticos das diferentes citocinas analisadas, visto a inter-relação entre elas no decorrer da resposta imune, bem como pela modulação que uma exerce sobre a atividade da outra. Observamos que o grupo controle apresentou um perfil característico de ativação da resposta imune, representado na tabela 2. Porém é nítido observar que a infecção pelo Mtb alterou o grau de ativação celular, visto o estabelecimento de novas correlações nos indivíduos com infecção latente e nos pacientes com tuberculose, sendo que foram formadas novas correlações principalmente em indivíduos com a doença ativa. De maneira geral as correlações novas formadas foram constituídas por citocinas importantes na resposta imune contra o bacilo, destacando relações positivas entre citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IP-10, IL-12, IL-6, IFN- γ , IL-17 e também correlações entre citocinas do padrão Th2 como IL-4 e IL-10. A maioria destas correlações formadas no paciente com tuberculose ativa não foram observadas nos indivíduos com infecção latente e controles, sendo portanto correlações características da progressão da doença.

Além das correlações estabelecidas entre as citocinas, a ativação imune dos monócitos foi avaliada mediante quantificação de mediadores solúveis CD163 e CD14, que classicamente estão associados com a ativação de monócitos e macrófagos durante processos inflamatórios. Nossos dados mostraram que ambos marcadores encontraram-se aumentados nos pacientes com a doença ativa, indicando maior grau de ativação de monócitos. Alavi-Naini e colaboradores mostraram que pacientes com tuberculose, assim como visto em nosso trabalho,

apresentaram níveis elevados de sCD14 [148], e em outro trabalho demonstraram níveis elevados de tal marcador no líquido bronco alveolar (BAL) de indivíduos com a doença ativa quando comparados aos controles [149]. Semelhante a sCD14, os resultados de sCD163 neste trabalho também comprovam dados da literatura. Knudsen e colaboradores demonstraram que pacientes com tuberculose ativa apresentaram níveis elevados de sCD163 em relação ao grupo controle, e ainda que pacientes co-infectados com HIV apresentaram os níveis ainda mais altos de tal marcador [150]. Apesar de aumentados na tuberculose, estes marcadores são indicativos de inflamação e ativação de monócitos e macrófagos estando correlacionados com processos infecciosos e inflamatórios e encontrando-se aumentados em outros processos patológicos que envolvam tais células, como HIV [151], malária [152, 153], doenças cardíacas [154], doenças inflamatórias crônicas [155] e mieloma múltiplo [156]. Dessa forma, tais marcadores não constituem marcadores específicos da tuberculose, mas sim, indicadores de inflamação exacerbada nos pacientes com a doença ativa, podendo sim constituir um grupo de marcadores correlacionados com progressão da doença.

Visto o aumento na produção de citocinas, quimiocinas e marcadores de ativação de monócitos, empregamos a análise de frequências de indivíduos nos diferentes grupos que apresentaram níveis elevados em relação a mediana global de tais mediadores. Desta forma, pudemos identificar uma bioassinatura da tuberculose pulmonar em nosso grupo amostral caracterizado por um perfil imunológico bastante ativado, marcado pelas frequências aumentadas para a maioria dos mediadores analisados, dos quais GM-CSF, IFN- α 2, IL-4, IL-5, IL-6, IP-10, MIP-1 α , RANTES, TNF- α , sCD163 e sCD14. Como demonstrado na Figura 6, pode-se observar que em pacientes com tuberculose ativa, a frequências de indivíduos altos produtores deste conjunto de marcadores foi elevada, evidenciada pelo maior preenchimento da matriz na Figura 6A, bem como gráfico de radar com maior dispersão na tuberculose ativa (Figura 6B).

Uma vez determinados os marcadores de ativação de monócitos, também avaliamos a atividade funcional dos destas células *in vitro*, relativa à produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio como demonstrado nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Quanto a produção de citocinas, não observamos diferenças significativas, sendo possível mostrar apenas uma tendência a maior produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6 quando estimuladas *in vitro* com o bacilo

inativado. Sabe-se que, *in vitro*, monócitos de pacientes com tuberculose produziram níveis elevados de TNF- α e IL-1 β [157]. Adicionalmente, outro estudo mostrou que PBMCs de pacientes com tuberculose, estimulados com antígenos micobacterianos, produziram maior quantidade de IL-4, IFN- γ e TNF- α , e ainda que células em cultura de pacientes com doença avançada produziram níveis ainda mais altos de TNF- α [158]. Um terceiro trabalho mostrou ainda que os monócitos de pacientes com tuberculose ativa, estimulados *in vitro* com LPS ou MDP (muramyl dipeptide) produziram maior quantidade de TNF- α e IL-6 que células de indivíduos com tuberculose latente e controles [159]. Nossos dados reforçam os achados da literatura, visto que mostramos que monócitos de pacientes com tuberculose estavam mais ativados e quando estimulados com antígenos do bacilo pareceram produzir níveis elevados de citocinas, principalmente de citocinas pró-inflamatórias.

Em estreita relação com as citocinas, a produção de espécies reativas de oxigênio constitui um mecanismo importante de defesa, sendo uma das primeiras respostas do sistema imune inato frente à infecções bacterianas [160]. Apesar de evidências de que a Mtb é capaz de escapar dos mecanismos efetores dependentes da formação de ROS [revisto por 161], alguns autores demonstraram que camundongos deficientes de NOX-2 (ROS-producing phagocyte NADPH oxidase) apresentaram maior carga bacteriana que os animais selvagens, após infecção [162, 163]. Lee e colaboradores demonstraram que monócitos humanos ativados *in vitro* com o antígeno de 30 kDa do Mtb apresentaram elevada produção de espécies reativas de oxigênio, especificamente íons superóxido, e ainda que tal estimulação assemelhou-se àquela gerada pela presença de LPS em cultura [164]. Também já foi demonstrado que monócitos de pacientes com tuberculose ativa estimulados com PPD apresentaram maior produção de H₂O₂ e superóxido quando comparados ao grupo controle [165]. De forma semelhante, nosso trabalho mostrou que monócitos de pacientes com tuberculose ativa produziram quantidades aumentadas de espécies reativas de oxigênio quando estimulados com Mtb inativado por calor em relação ao grupo controle, e ainda que nenhuma diferença foi encontrada em condições espontâneas ou na presença de PMA. Contraditoriamente, outro estudo previamente publicado descreveu que macrófagos de pacientes com a doença ativa apresentaram redução na produção de espécies reativas de oxigênio, diferente dos dados por nós demonstrados [166].

No desenvolvimento da resposta imune contra patógenos, mudanças no perfil transcricional das células são necessários para a geração da resposta mais apropriada ao hospedeiro, mobilizando genes envolvidos em processos chave na eliminação do microrganismo [167]. A regulação da expressão gênica pode ocorrer por vários mecanismos dentre os quais estão as modificações epigenéticas, que envolvem a metilação do DNA, modificações na cauda de histonas e microRNAs. A associação de tais mudanças a processo infecciosos já foi demonstrada, como a indução de metilação do DNA em indivíduos infectados com *Helicobacter pylori*, devido a efeitos diretos da infecção ou pela inflamação gerada no processo infeccioso [168], e também a modulação vista na infecção por HIV, na qual notou-se aumento na expressão de DNMT1, gene que codifica uma enzima responsável pela metilação do DNA [169]. No contexto da tuberculose, alguns trabalhos já demonstraram ocorrência de alterações epigenéticas relacionadas à infecção. Andraos e colaboradores evidenciaram que pacientes com a doença ativa apresentaram variação quanto a metilação de ilha CpG do receptor da vitamina D (VDR) em células da linhagem linfoblástica em relação ao grupo controle, a qual pode estar associada à susceptibilidade à doença [170]. Liu e colaboradores mostraram ainda que pacientes com tuberculose apresentaram elevada expressão do microRNA miR-144, o qual estava relacionado à inibição da produção de citocinas TNF- α e IFN- γ , bem como da proliferação de células T nestes indivíduos [171].

Assim, os mecanismos moleculares que acarretam as modificações no perfil de ativação dos monócitos apresentadas pelos pacientes com tuberculose em nosso estudo podem estar relacionados às alterações epigenéticas, e o perfil de alterações pode, por sua vez, correlacionar-se ao estágio da doença. Evidências de que mudanças epigenéticas atuam como marcadores de doenças foram demonstradas principalmente no campo dos tumores, sendo usados clinicamente para detecção precoce da doença, para classificação de tumor, bem como para monitorar a resposta ao tratamento anti-tumoral [172, 173].

Tais modificações são moduladas por enzimas e podem atuar reprimindo ou ativando a expressão de genes nestas células. A expressão de enzimas responsáveis pelas alterações epigenéticas podem atuar como indicativo da ocorrência destas modificações. Em nosso trabalho mostramos que pacientes com tuberculose ativa pareceram apresentar menor expressão de enzimas epigenéticas

ligadas a repressão gênica e aumento da expressão daquelas responsáveis pela ativação gênica, como observado nas Figuras 12 e 13 respectivamente, indicando aumento na acessibilidade ao DNA e na atividade transcricional de genes nestas células quando comparados ao controle.

Visto a regulação apresentada em relação às enzimas responsáveis pela metilação do DNA, dentre as quais cita-se as DNMTs que estão relacionadas à inserção de grupamentos metil a regiões de ilha CpG, bem como as demetilases, relacionada à remoção de tais grupamentos, analisamos a porcentagem de metilação global. Observamos que os pacientes com tuberculose ativa apresentaram redução na metilação do DNA, corroborando os dados obtidos para expressão gênica das enzimas, bem como fornecendo suporte para a ativação imune dos monócitos, uma vez que tal redução reflete menor repressão transcricional e maior atividade destas células. A redução no padrão de metilação global do DNA já foi demonstrada em outras doenças inflamatórias como nos cânceres. Neste sentido, Gama-Sosa e colaboradores mostraram que concentrações de grupamentos metil estavam globalmente reduzidos em células tumorais quando comparadas a tecidos normais [174]. Outros dados da literatura mostraram que na infecção pelo vírus da hepatite B, a expressão da proteína pX induziu redução na expressão da enzima DNMT3B acarretando hipometilação global de regiões satélites repetidas. O mesmo trabalho ainda mostrou que, de maneira controversa, tal proteína induziu aumento na expressão de DNMT1 e DNMT3A, as quais são responsáveis por hipermetilação regional em genes supressores tumorais específicos [175].

Tais achados mostram que diferentes modulações epigenéticas ocorrem simultaneamente para que o processo patológico se estabeleça, reduzindo a expressão de genes protetores ao passo que aumenta a expressão de genes envolvidos na progressão da doença. Entender quais genes estão sendo modulados permitirão a compreensão de como tais alterações epigenéticas controlam o processo saúde-doença, e ainda entender de que maneira poderão ser utilizados como marcadores diagnósticos, prognósticos ou terapêuticos. Novas análises dos nosso achados com casuísticas maiores serão necessários para confirmação de tais resultados, bem como a busca de quais genes estão sendo alvos destas modulações em cada um dos grupos de estudo.

Além de buscar biomarcadores que fossem capazes de diferenciar os indivíduos com infecção latente daqueles que desenvolvem a forma ativa,

analisamos a relação estabelecida entre os mediadores aumentados no plasma destes pacientes com tuberculose ativa e a gravidade da doença, mediante análise de grau de lesão pulmonar. Demonstramos a existência de correlação positiva entre níveis plasmáticos de CD163 e grau de lesão pulmonar. Dados já publicados correlacionaram o aumento de sCD163 com o aumento de mortalidade em pacientes com tuberculose pulmonar, confirmando a associação encontrada no presente estudo com o pior prognóstico [150]. Vale ressaltar que este é um dos primeiros trabalhos que correlacionam diretamente os níveis deste marcador com a gravidade da doença, mediante análise da lesão pulmonar desenvolvida.

Além de CD163, TNF- α , também aumentado no plasma, apresentou correlação positiva com o quadro de lesão nos pacientes. Apesar de tal citocina estar associada a fatores protetores na infecção pelo Mtb, como visto anteriormente, também existem evidências de que TNF- α esteja relacionado com respostas imunopatológicas, sendo o principal mediador da destruição tecidual no pulmão [176]. Dados ainda demonstraram que níveis elevados desta citocina estavam associados com inflamação excessiva, necrose e caquexia [177, 178]. A correlação encontrada corrobora outros autores que também demonstraram a associação positiva entre níveis de TNF- α e a gravidade da tuberculose [179], classificando tal marcador, juntamente com sCD163, como possíveis biomarcadores de progressão da tuberculose pulmonar.

Outros fatores solúveis aumentados nos pacientes, dentre os quais estão IP-10, IL-6, sCD14 e proteína C reativa (PCR), também foram analisados quanto a correlação com a gravidade da tuberculose. A PCR já é utilizada na clínica, sendo considerada o marcador mais sensível e específico para a resposta de fase aguda (RFA), uma vez que sua concentração no plasma reflete diretamente o processo patológico. Estudos tem mostrado que a PCR está aumentada em pacientes com tuberculose, e que houve redução dos níveis de tal marcador no decorrer do tratamento, indicando o papel no diagnóstico presumível e marcador do efeito da terapia nestes pacientes [180]. O aumento nos níveis da PCR pareceram estar associados a piora no quadro de outras doenças como na pneumonia [181], porém nossos dados não demonstraram correlação da PCR com o grau de doença apresentada pelos pacientes.

Os níveis de sCD14 também não correlacionaram-se com os graus de lesão pulmonar, apesar de aumentados nos pacientes com tuberculose ativa. Contrariando

dados demonstrados por Wieland e colaboradores de que animais deficientes de CD14 sobreviviam à infecção letal por Mtb por apresentarem redução na inflamação pulmonar, representada por menor quantidade de células no pulmão e porcentagem reduzida de tecido inflamado [182]. Além do papel na tuberculose, os níveis de sCD14 vem sendo correlacionados com aumento na gravidade de outras doenças, por exemplo, no HIV, no qual seu aumento está associado ao desenvolvimento de outras comorbidades em indivíduos infectados [70].

Assim como PCR e sCD14, IL-6 não estabeleceu correlação positiva com a progressão da tuberculose, contrariando dados da literatura que mostraram tal associação. Chowdhury e colaboradores demonstraram que os pacientes com tuberculose ativa apresentaram níveis elevados de IL-6 e que este aumento estava diretamente relacionado com redução no índice de massa corporal, com aumento da carga bacteriana e de lesão pulmonar [183].

Por fim, também não foi possível encontrar no presente estudo correlação significativa entre os níveis de IP-10 nos pacientes com tuberculose e a progressão da doença. Estudos tem demonstrado o papel desta quimiocina no monitoramento terapêutico, uma vez que foi observada redução dos níveis de IP-10 no decorrer do tratamento, concomitante a redução da inflamação gerada pela infecção, enquanto que em pacientes não curados os níveis mantiveram-se aumentados [134]. Níveis elevados de IP-10 também já foram relacionados com caquexia e febre [134], indicando o possível papel de tal marcador como indicador de piores quadros de tuberculose, contrariando os dados apresentados neste estudo que não permitiram tal associação.

De maneira geral, como demonstrado na Figura 14, nossos dados indicam maior ativação imune nos pacientes com tuberculose ativa quando comparados aos demais grupos estudados, com aumento de citocinas pró-inflamatórias no plasma, como IL-12, TNF- α , IL-6, IL-5 e IP-10, concomitante ao aumento de marcadores de ativação de monócitos e macrófagos, como sCD163 e sCD14. Confirmando estes achados, monócitos dos pacientes também mostraram-se mais ativadas funcionalmente *in vitro* quando estimuladas com antígenos micobacterianos, produzindo elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio, bem como maior tendência a produzir IL-6 e TNF- α . Demonstramos ainda que este perfil de ativação pode estar modulado por modificações epigenéticas, visto a tendência à menor expressão de enzimas repressoras e à maior expressão de enzimas ativadoras da

expressão gênica nos pacientes com maior grau de ativação celular, bem como a redução no padrão de metilação global do DNA. Em relação aos biomarcadores, foi possível identificar que em conjunto TNF- α , IP-10, IL-6, IL-5, sCD163 e sCD14 podem diferenciar indivíduos não infectados e com infecção latente daqueles com a doença ativa, podendo atuar como marcadores da tuberculose, e ainda que dos marcadores aumentados nos pacientes doentes, os níveis de sCD163 e TNF- α apresentaram correlação direta com o quadro de lesão pulmonar, constituindo possíveis ferramentas prognósticas na tuberculose pulmonar.

Figura 14. Esquema final dos resultados encontrados evidenciando uma proposta de bioassinatura da tuberculose ativa. Estão mostrados as diferenças na frequência de “altos” produtores os mediadores analisados, bem com as alterações na expressão de enzimas epigenéticas relacionadas à ativação e repressão gênica e alterações no padrão global de metilação dos monócitos. Na tuberculose ativa a redução na metilação global e a tendência à redução na expressão de enzimas de repressão gênica e ao aumento na expressão de enzimas de ativação acarretam estimulação imune exacerbada e lesão pulmonar, a qual como visto está diretamente relacionada ao aumento de sCD163 e TNF- α .

7.CONCLUSÕES

Como conclusões do presente trabalho temos:

- Níveis plasmáticos de IL-6, IP-10, TNF- α , IL-5, sCD163 e sCD14 aumentados nos pacientes com tuberculose ativa podem atuar como biomarcadores da doença em relação à infecção latente.
- Na tuberculose ativa, monócitos estão mais ativados pois produzem níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e tendem a produzir mais citocinas.
- Modificações epigenéticas parecem estar relacionados com o perfil mais ativado dos monócitos nos pacientes com tuberculose ativa.
- Dentre os fatores aumentados, sCD163 e TNF- α , quando analisados em conjunto, estão diretamente relacionados com casos mais graves de tuberculose, constituindo possíveis ferramentas prognósticas na tuberculose pulmonar.

Nossos dados constituirão uma referência para futuras análises com casuísticas maiores que possibilitem a validação dos nossos achados e a determinação de biomarcadores plasmáticos que poderão ter uma aplicação clínica direta, sendo utilizados como ferramentas para o diagnóstico e prognóstico da tuberculose pulmonar.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors (Vancouver Style)
Grupo de Vancouver, Outubro 2007.

1. Daniel TM, Bates JH, Downes KA. History of tuberculosis. In: Bloom BR, ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington DC: ASM Press 1994:13–24.
2. WHO. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011.
3. CDC: Reported Tuberculosis in the United States. In. Atlanta, GA: US Department of Health, 2007.
4. Sahn SA, Neff TA. Miliary tuberculosis. *Am J Med* 1974, 56(4): 494-505.
5. WHO: *Global Tuberculosis Report 2014*:1-3.
6. Vynnycky E, Fine PE: Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *American journal of epidemiology* 2000; 152(3):247-263.
7. Saúde SdVe: Boletim Epidemiológico – Especial Tuberculose. In., vol. 43: Ministério da Saúde 2012:2-12.
8. Barreira D, *et al.* Evaluation of tuberculosis control strategies in Brazil. *Rev Saude Publica* 2007; 41 Suppl 1: 4-8.
9. McShane H, Jacobs WR, Fine PE, Reed SG, McMurray DN, Behr M, Willians A, Orme IM: BCG: myths, realities, and the need for alternative vaccine strategies. *Tuberculosis* 2012; 92(3):283-288
10. Kagina BM, Abel B, Scriba TJ, Hughes EJ, Keyser A, Soares A, Gamiieldien H, Sidibana M, Hatherhill M, Gelderbloem S *et al.*: Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010; 182(8):1073-1079.
11. Perrin FM, *et al.* Biomarkers of treatment response in clinical trials of novel antituberculosis agents. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 481-90.
12. Parida SK, Kaufmann SH. The quest for biomarkers in tuberculosis. *Drug Discov Today* 2010; 15(3-4):148-57.
13. Jain A, Mondal R. Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53(2):145-50.
14. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The Immune Response in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:475-527.
15. Riley RL, Mills CC, Nyka W, Weinstock N, Storey PB, Sultan LU, Riley MC, Wells WF: Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in tuberculosis ward. 1959. *American Journal of epidemiology* 1995; 142(1):3-14.
16. Gordon SB, Read RC: Macrophage defences against respiratory tract infections. *British medical bulletin* 2002; 61:45-61.
17. Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G: Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Seminars in immunopathology* 2013, 35(5):563-583.
18. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Dev. Immunol.* 2011:405310.
19. Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yermeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan m *et al.*: Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2004; 6(10):946-959.
20. Mortasz E, Adcock IM, Tabarsi P, Masjudi MR, Mansouri D, Velayati AA, Casanova JL, Barnes PJ. Interaction of pattern recognition receptors with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 2014.

21. Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, Kozak R, Guillot L, Veyrier F, Kobayashi KS, Flavell RA, Gros P, Behr MA: NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. *Journal of immunology* 2008; 181(10):7157-7165.
22. Martinon F, Burns K, Tschopp J: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 2002; 10(2):416-426.
23. Armstrong JA, Hart PD. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* 1971; 134:713-40.
24. Schnappinger D, Schoolnik GK, Ehrt S: Expression profiling of host pathogen interactions: how *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage adapt to one another. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2006; 8(4):1132-1140.
25. Gil DP, Leon LG, Correa LI, Maya JR, Paris SC, Garcia LF, Rojas M: Differential induction of apoptosis and necrosis in monocytes from patients with tuberculosis and healthy control subjects. *The Journal of infectious diseases* 2004; 189(11):2120-2128.
26. Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nuñez GJ, Kincaid E, Tamura T, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J. Immunol.* 2007; 179:2509-19.
27. Apostolou I, Takahama Y, Belmant C, Kawano T, Huerre M, Marchal G, Cui J, Taniguchi M, Nakauchi H, Fournie JJ, Kourilsky P, Gachelin G. Murine natural killer (NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5141-6.
28. Kaufmann SH. Gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 2272-9.
29. Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 1998; 19: 491-4.
30. Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 1999; 67: 3980.
31. Silva CL, Bonato VL, Lima KM, Coelho-Castelo AA, Faccioli LH, Sartori A, De Souza AO, Leao SC. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 197: 11-8.
32. Grotzke JE, Lewinsohn DM. Role of CD8+ T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 2005; 7: 776-88.
33. Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* 2008; 41: 79-83.
34. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gamma/delta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2006; 177: 4662-9.
35. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Winter N, Sher A, Germain RN. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity* 2008; 28: 271-84.
36. Rook GA, Dheda K, Zumla A. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine* 2005; 23: 2115-20.

37. Tramontana JM, Utaipat U, Molloy A, et al. Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Med* 1995; 1:384–97.
38. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat. Immunol.* 2009; 10:943–48.
39. Peters W, Ernst JD. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2003; 5:151–58.
40. Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV, Orme IM. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2001; 69:1722–28.
41. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2012; 12(5):352–366.
42. Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang JC, Sherman DR, Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS biology* 2004; 2(11):e367.
43. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG: Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994; 263(5147):678–681.
44. Armstrong J, D'Arcy Hart P. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 1971; 134: 713–40.
45. Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL: Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infection and immunity* 1979; 35(2):250–257.
46. Behar SM, Divangahi M, Remold HG: Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nature reviews Microbiology* 2010; 8(9):668–674.
47. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 20–30.
48. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infect Immun* 1999; 67: 6461–72.
49. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 1998; 161(5): 2636–41.
50. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. *Infect and Immun.* 1996, 64:683–690.
51. Gonzalez-Juarrero M, Shim TS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, Orme IM. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. *J. Immunol* 2003; 171:3128–35.
52. Geissmann F, Jung S, Littman DR: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19(1):71–82.
53. Moller HJ. Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest* 2012, 72:1–13.

54. Law SK, Micklem KJ, Shaw JM, Zhang XP, Dong Y, Willis AC, Mason DY. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *Eur J Immunol* 1993; 23:2320 – 5.
55. Maniecki MB, Moller HJ, Moestrup SK, Moller BK. CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. *Immunobiology* 2006; 211:407 – 17.
56. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409:198 – 201.
57. Fabrik BO, Polfliet MM, Vloet RP, van der Schors RC, Ligtenberg AJ, Weaver LK, Geest C, Matsuno K, Moestrup SK, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood* 2007; 109:5223 – 9.
58. Fabrik BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 2009; 113:887 – 92.
59. Moller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, Moestrup SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood* 2002; 99:378 – 80.
60. Droste A, Sorg C, Hogger P. Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256:110 – 3.
61. Etzerodt A, Maniecki MB, Moller K, Moller HJ, Moestrup SK. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2010; 88:1201 – 5.
62. Reiss K, Saftig P. The 'a disintegrin and metalloprotease' (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol* 200; 20:126 – 37.
63. Weaver LK, Hintz-Goldstein KA, Pioli PA, Wardwell K, Qureshi N, Vogel SN, Guyre PM. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2006; 80:26 – 35.
64. Timmermann M, Hogger P. Oxidative stress and 8-isoprostaglandin F (2alpha) induce ectodomain shedding of CD163 and release of tumor necrosis factor-alpha from human monocytes. *Free Radic Biol Med* 2005; 39:98 – 107.
65. Sulahian TH, Pioli PA, Wardwell K, Guyre PM. Cross-linking of FcgammaR triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2004; 76:271 – 7.
66. Kusi KA, Gyan BA, Goka BQ, Doodoo D, Obeng-Adjei G, Troye-Blomberg M, Akanmori BD, Adjimani JP. Levels of soluble CD163 and severity of malaria in children in Ghana. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1456 – 60.
67. Fischer-Smith T, Tedaldi EM, Rappaport J. CD163/CD16 coexpression by circulating monocytes/macrophages in HIV: potential biomarkers for HIV infection and AIDS progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; 24:417 – 21.
68. Tippet E, Cheng WJ, Westhorpe C, Cameron PU, Brew BJ, Lewin SR, Jaworowski A, Crowe SM. Differential expression of CD163 on monocyte subsets in healthy and HIV-1 infected individuals. *PLoS One* 2011; 6:e19968.

69. Burdo TH, Lentz MR, Autissier P, Krishnan A, Halpern E, Letendre S, Rosenberg ES, Ellis RJ, Williams KC. Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy. *J Infect Dis* 2011; 204:154 – 63.
70. Wilson EM, Singh A, Hullsiek KH, Gibson D, Henry WK, Lichtenstein K, Önen NF, Kojic E, Patel P, Brooks JT, Sereti I, Baker JV. Monocyte-activation phenotypes are associated with biomarkers of inflammation and coagulation in chronic HIV infection. *J. Infect Dis* 2014; 10.1093.
71. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14:121-5.
72. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14 serves as the cellular receptor for complexes of lipopolysaccharide with lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1431-3.
73. Dentener MA, Bazil V, Von Asmuth EJU, Ceska M, Buurman WA. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1993; 150:2885-91.
74. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A *et al.* CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994; 1:509-16.
75. Yu W, Soprana E, Cosentino G, Volta M, Lichensteins HS, Viale G, Vercelli D. Soluble CD14 confers responsiveness to both lipoarabinomannan and lipopolysaccharide in a novel HL-60 cell bioassay. *J Immunol* 1998; 161:4244-51.
76. Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrman R, Ferrara P. Release from a human monocyte-like cell clone of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol* 1993; 23:2144-51.
77. Durieux JJ, Vita N, Popescu O *et al.* The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur J Immunol* 1994; 24:2006-12.
78. Kruger C, Shutt C, Obertacke U *et al.* Serum levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin Exp Immunol* 1991; 85:297-301.
79. Pforte A, Schiessler A, Gais P, Beif B, Ehlers M, Scutt C, Ziegler-Heitbrock HWL. Expression of CD14 correlates with lung function impairment in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 1994; 105: 349-54.
80. Wiersma SR, Ortega J, Sobel E, Weinberg KI. Clinical importance of myeloid-antigen expression. In acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med* 1991; 324:800-8.
81. Lien E, Aukrust P, Sundan A, Muller F, Froland SS, Espevik T. Elevated levels of serum-soluble CD14 in human immunodeficiency virus type 1 infection: correlation to disease progression and clinical events. *Blood* 1998; 92:2084-92.
82. Biel M., Wascholowski V., Giannis A. Epigenetics—An Epicenter of Gene Regulation: Histones and Histone-Modifying Enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 44, 3186 – 3216
83. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol* 2009; 219:243-50.
84. Portela, A. & Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28:1057–1068

85. Bagot, R.C. and Meaney, M.J. Epigenetics and the biological basis of gene - environment interactions. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 2010; 49:752–771
86. Fernandez-Morera, J.L. et al. Epigenetic regulation of the immune system in health and disease. *Tissue Antigens* 2010; 76:431– 439
87. Paulsen M, Fergusson-Smith A. C. Dna methylation in genomic imprinting, development, and disease. *The Journal of pathology* 2001; 195:97-110.
88. Carson WF, Cavassani KA, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics* 2011; 6:273-83
89. Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 2002; 3:224-9.
90. Hublitz P, Albert M, Peters AH. Mechanisms of transcriptional repression by histone lysine methylation. *Int J Dev Biol* 2009; 53:335-54.
91. Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* 2004; 6:73-7
92. Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14:155-64
93. Takebayashi S, Tamura T, Matsuoka C, Okano M. Major and essential role for the DNA methylation mark in mouse embryogenesis and stable association of DNMT1 with newly replicated regions. *Molecular and Cellular Biology* 2007; 27:8243–8258.
94. Song Y, Wu K., Dhaubhadel S, An L, Tian L. Arabidopsis DNA methyltransferase AtDNMT2 associates with histone deacetylase AtHD2s activity. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; 396:187-192.
95. Okano M, Takebayashi S, Okumura K, Li E. Assignment of cytosine-5 DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b to mouse chromosome bands 12A2-A3 and 2H1 by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* 1999; 86:333-334.
96. Haberland M, Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics* 2009; 10:32-42.
97. Basta J, Rauchman M. The nucleosome remodeling and deacetylase complex in development and disease. *Translational Research* 2014; 1-12.
98. Kadamb R, Mittal S, Bansal N, Batra H, Saluja D. Sin3: Insight into its transcription regulatory functions. *Euro J Cell Biology* 2013; 92:237-246.
99. Carson W.F., Cavassani K.A., Dou Y. and Kunkel S.L. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics* 2011; 6:273-283.
100. Bone RC. Sir Isaac Newton sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med* 1996; 24(7):1125-8.
101. Wen H, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood* 2008; 111:
102. Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* 2003; 4:616-23.

103. Ishii M, Wen H, Corsa CA, Liu T, Coelho AL, Allen RM, Carson WFt, Cavassani KA, Li X, Lukacs NW, Hogaboam CM, Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood* 2009; 114:3244-54
104. Cassol, E., Cassetta, L., Rizzi, C., Alfano, M., Poli, G., M1 and M2a Polarization of Human Monocyte-Derived Macrophages Inhibits HIV-1 Replication by Distinct Mechanisms. *J Immunol* 2009; 182:6237 – 6246.
105. Su, R-C. et al. Epigenetic control of IRF1 responses in HIV exposed seronegative versus HIV-susceptible individuals. *Blood* 2011; 117:2649-2657
106. Maria M. Esterhuysen, Heinz G. Linhart and Stefan H.E. Kaufmann. Can the battle against tuberculosis gain from epigenetic research? *Trends in Microbiology* 2012: 20.
107. Abakay O, Abakay A, Sen HS, Tanrikulu AC. The relationship between inflammatory marker levels and pulmonary tuberculosis severity. *Inflammation* 2014.
108. Frankestein Z, Alon U, Cohen I. The immune-body cytokine network defines a social architecture of cell interactions. *Biol Direct* 2006; 1:32.
109. Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJ, van Deutekom H, Speelman P, van der Poll T. Tumor necrosis factor and interleukin-1 inhibitors as markers of disease activity of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1328–31.
110. Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Eguale T, Hiwot K, Aderaye G, et al. Circulating TNF-alpha. TGF-beta and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J. Immunol* 2001; 53(1):85-91.
111. Portales-Perez DP, Baranda L, Layseca E, Fierro NA, de la Fuente H, Rosenstein Y, et al. Comparative and prospective study of different immune parameters in healthy subjects at risk for tuberculosis and in tuberculosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(2):299-307.
112. Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infection and Immunity* 1993; 61(8): 3482–3489.
113. Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SHE. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Infection and Immunity* 1997; 65(5):1936–1938.
114. Serbina NV and Flynn JL. Early emergence of CD8+ T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infection and Immunity* 1999; 67(8):3980–3988.
115. Yu K, Mitchell C, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR, Chan J. Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: *M. tuberculosis* is resistant to peroxynitrite anion. *Tubercle and Lung Disease* 1999; 79(4):191–198.
116. Scanga CA, Mohan VP, Yu K et al. Depletion of CD4+ T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon γ and nitric oxide synthase 2. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192(3):347–358.
117. Mohan VP, Scanga CA, Yu K et al. Effects of tumor necrosis factor α on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and Immunity* 2001; 69(3):1847–1855.

118. Deveci F, Akbulut HH, Trugut T, Muz MH. Changes in serum cytokines levels in active tuberculosis with treatment. *Mediators Inflamm* 2005; 2005(5): 256-62.
119. Flynn JL and Chan J. Tuberculosis latency and reactivation. *Inf and Immunol* 2001; 69(7):4195-4201.
120. Van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*; 15(2): 294-309.
121. Zahran WA, Ghonaim MM, Koura BA, El-Banna H, Ali SM, El-Sheikh N. A study of the role of IL-12 in Pulmonary Tuberculosis using the whole blood flowcytometry technique. *Egyptian J Immunol* 2006; 13(1):53-65.
122. Verbon A, Juffermans N, van Deventer SJH, Speelman P, van Deutekom H, van del Poll T. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:110-113.
123. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2:S2
124. Wallis RS, Ellner JJ. Cytokines and tuberculosis. *J Leuk Biol* 1994; 55:676-81.
125. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reinfenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun* 1997; 65:4843-9.
126. Lopes FHZ, Assis LC, Pires Neto RJ, Botelho KP, Sá KM, Frota CC, Correia JW, Freitas MVC. Serum levels of interleukin-6 in contacts of active pulmonary tuberculosis. *J Bras Patl Med Lab* 2013; 49(6):410-414.
127. Takatsu K. Interleukin 5 and b cells differentiation. *Cytokines Growth Factor Rev* 1998; 9:25-35.
128. Lasco TM, Turner OC, Cassone L, Sugawara I, Yamada H, McMurray DN, Orme IM. Rapid Accumulation of Eosinophils in Lung Lesions in Guinea Pigs Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2004; 72(2):1147-1149.
129. Erb KJ, Kirman J, Delahunt B, Chen W, Le Gros G. IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of M bovis-BCG infection in mice. *Immunol and Cell Biol* 1998; 76:41-46.
130. Diedrich CR, Mattila JT, Flynn L. Monocyte-derived IL-5 reduces TNF production by Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells during SIV/M. tuberculosis coinfection. *J Immunol* 2013; 190:6320-6328.
131. Oliver BG, Elliott JH, Saphonn V, Vun MC, French MA, Price P. Interferon- γ and IL-5 production correlate directly in HIV patients co-infected with Mycobacterium tuberculosis with or without immune restoration disease. *AIDS Research and Human retroviruses* 2010; 26:1287-89.
132. Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc Biol* 1997; 67:246-257.
133. Juffermans NP, Verbon A, Van Deventer SJ, Van Deutekom H, Belisle JT, Ellis ME, et al. Elevated chemokine concentrations in sera of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients with tuberculosis: a possible role for mycobacterial lipoarabinomannan. *Infect Immun* 1999; 67:4295-4297.
134. Azzurri A, Sow OY, Amedei A, Bah B, Diallo S, Peri G, Benagiano M, D'Elia MM, Mantovani A, Del Prete G. IFN- γ -inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease

- activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes and Infection* 2005; 7:1–8.
135. Sauty A, Dziejman M, Taha RA, Iarossi AS, Neote K, Garcia-Zepeda EA *et al.* The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 1999; 162:3549-3558.
 136. Rhoades AR, Cooper AM, Orme IM. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63:3871-3877.
 137. Ruhwald M, Aabye MG and Ravn P. IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2012; 12(2):175–187.
 138. Algood HM, Lin PL, Yankura D, Jones A, Chan J, Flynn JL. TNF influences chemokine expression of macrophages *in vitro* and that of CD11b+ cells *in vivo* during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2004; 172:6846–6857.
 139. Maertzdorf J, Weiner J, Mollenkopf HJ, TBotnotTB Network, Bauer T, Prasse A, Müller-Quernheim J, Kaufmann SH. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. *PNAS* 2012; 109(20):7853-8.
 140. Shibata Y, Barclay PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 2001; 15(4):557-67.
 141. Szeliga J, Daniel DS, Yang CH, Sever-Chroneos Z, Jagannath C, Chroneos ZC. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor-mediated innate responses in tuberculosis. *Tuberculosis* 2008; 88(1):7-20.
 142. Gonzalez-Juarrero M, Hatttle JM, Izzo A, Junqueira-Kipnis AP, Shim TS, Trapnell BC, Cooper AM Orme IM. Disruption of granulocyte-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(6):914-22.
 143. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001; 2(2):102-7.
 144. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T, Matsushima K. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(4):1474-7.
 145. Saukkonen JJ, Bazydlo B, Thomas M, Strieter RM, Keane J, Kornfeld H. Beta-chemokines are induced by mycobacterium tuberculosis and inhibit its growth. *Infect Immun* 2002; 70(4):1684-93.
 146. Matthews K, Wilkinson KA, Kalsdorf B, Roberts T, Diacon A, Walzl G, Wolske J, Ntsekhe M, Syed F, Russell J, Mayosi BM, Dawson R, Dheda K, Wilkinson RJ, Hanekom WA, Scriba TJ. Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis. *Tuberculosis* 2011; 91(6):587-93.
 147. Chen X, Zhang M, Liao M, Graner MW, Wu C, Yang Q, Liu H, Zhou B. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+T cells. *Am J Resp Crit Care* 2010; 181: 734-42.
 148. Alavi-Naini R, Salimi S, Sharifi-Mood B, Davoodikia AA, Moody B, Naghavi A. Association between the CD14 gene C-159T polymorphism and serum soluble CD14 pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16(10):1383-7.

149. Hoheisel G, Zheng L, Teschler H, Striz I, Costabel U. Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonar tuberculosis. *Chest* 1995; 108(6):1614-6.
150. Knudsen TB, Gustafson P, Kronborg G, Kristiansen TB, Moestrup SK, Nielsen JO, Gomes V, Aaby P, Lisse I, Moller HJ, Eugen-Olsen J. Predictive value of soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 serum levels for survival in verified tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(9):730-5.
151. Burbo TH, Lentz MR, Autissier P, Krishnan A, Halpern E, Letendre S, Rosenberg ES, Ellis RJ, Williams KC. Soluble CD163 made by monocytes/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy. *J Infect Dis* 2011; 204(1):154-163.
152. Kusi KA, Gyan BA, Goka BQ, Dodoo D, Obeng-Adjei G, Troye-Blomberg M, Akanmori BD, Adjimani JP. Levels of soluble CD163 and severity of malaria in children in Ghana. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(9):1456-60.
153. Wenisch C, Wenisch H, Parschalk B, Vanijanonta S, Burgmann H, Exner M, Zedwitz-Liebenstein K, Thalhammer F, Georgopoulos A, Graninger W, Looareesuwan S. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with acute Plasmodium falciparum malaria. *Clin Exp Immunol* 1996; 105(1):74-8.
154. Aristoteli LP, Moller HJ, Bailey B, Moestrup SK, Kritharides L. The monocyte lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006; 184(2):342-7.
155. Buechler C, Eisinger K, Krautbauer S. Diagnostic and prognostic potencial of the macrophage specific receptor CD163 in inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2013; 12(6):391-402.
156. Andersen MN, Abildgaard N, Maniecki MB, Moller HJ, Andersen NF. Monocyte/macrophage-derived soluble CD163: a novel biomarker in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2014; 93(1):41-7.
157. Wang CH, Lin HC, Liu CY, Huang KH, Huang TT, Yu CT, Kuo HP. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine secretion in peripheral blood monocytes from pulmonary tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(3):283-291.
158. Dlugovitzky D, Bay ML, Ratani L, Fiorenza G, Vietti L, Farroni MA, Bottasso OA. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol* 2000; 122:343-349.
159. Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in tumor necrosis factor alpha- and interleukin--secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1991; 59(9):3021-3025.
160. Bogdan C, Rölinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1):64-76.
161. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:93-129.
162. Jung YJ, LaCourse R, Ryan L, North RJ. Virulent but not Avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T Helper 1-dependent, Nitric Oxide Synthase 2-independent Defense in Mice. *J Exp Med* 2002; 196(7):991-998.

163. Ng VH, Cox JS, Sousa AO, MacMicking JD, McKinney JD. Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol* 2004; 52(5):1291-302.
164. Lee HM, Shin DM, Kim KK, Lee JS, Paik TH, Jo EK. Roles of reactive oxygen species in CXCL8 and CCL2 expression in response to the 30-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 2009; 29:46-56.
165. Yang CS, Shin DM, Lee HM, Son JW, Akira S, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J, Ichijo H, Jo EK. ASK1-p38 MAPK-p47phox activation is essential for inflammatory responses during tuberculosis via TLR2-ROS signaling. *Cell Microbiol* 2008; 10(3):741-54.
166. Kumar V, Jindal SK, Ganguly NK. Release of reactive oxygen and nitrogen intermediates from monocytes of patients with pulmonary tuberculosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55(2):163-9.
167. Jenner RG, Young RA. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:281-294.
168. Maekita T et al. (2006) High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res* 2006; 12:989–995.
169. Giordanengo V et al. Epigenetic reprogramming of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) in HIV-1-infected CEM T cells. *FASEB J* 2004; 18:1961-1963.
170. Andraos C, Koorsen G, Knight JC, Bornman L. Vitamin D receptor gene methylation is associated with ethnicity, tuberculosis and TaqI polymorphism. *Hum Immunol* 2011; 72(3):262-268.
171. Liu Y, Wang X, Jiang J, Cao Z, Yang B, Cheng X. Modulation of t cell cytokine production by miR-144* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Immunol* 2011; 48:1084-1090.
172. Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 68:1–11.
173. Verma M, et al. (2006) Genetic and epigenetic biomarkers in cancer: improving diagnosis, risk assessment, and disease stratification. *Mol Diagn Ther* 2006; 10:1–15.
174. Gama-Sosa, M. A. et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 1983; 11:6883–6894.
175. Park, I. Y., Sohn, B. H., Yu, E., Suh, D. J., Chung, Y. H., Lee, J. H., Surzycki, S. J., Lee, Y. I. Aberrant epigenetic modifications induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology* 2007; 132:1476–1494.
176. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunology* 2011; 4(3):271–278.
177. Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infection and Immunity* 2000; 68(12):6954–6961.
178. Ehlers S, Benini J, Held HD, Roeck C, Alber G, Uhlig S. $\alpha\beta$ T cell receptor-positive cells and interferon- γ , but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria induced pulmonary immunopathology. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194(12):1847–1859.

179. Andrade Junior DR, Santos DA, Castro Id, Andrade DR. Correlation between sérum tumor necrosis fator alpha levels and clinical severity of tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 2008; 12(3):226-33.
180. Peresi E, Silva SMUR, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Citocinas e proteínas de fase aguda do soro como marcadores de regressão da resposta inflamatória ao tratamento da tuberculose pulmonar. *J Bras Pneumol* 2008; 34(11):942-949.
181. Almirall J, Bolívar I, Toran P, Pera G, Boquet X, balanzó X, Sauca G. Contribution of C-reactive protein to the diagnosis and assessment of severity of community-acquired pneumonia. *Chest* 2004; 125(4):1335-1342.
182. Wieland CW, van der Windt GJ, Wiersinga WJ, Florquin S, van der Poll T. CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis. *Immunol* 2008; 125(2):272-9.
183. Chowdhury IH, Ahmed AM, Choudhuri S, Sem A, Hazra A, Pal NK, Bhattacharya B, Bahar B. Alteration of sérum inflammatory cytokines in active pulmonar tuberculosis following anti-tuberculosis drug therapy. *Mol Immunol* 2014; 62(1):159-68.

ANEXOS

ANEXO I – Liberação do Comitê de Ética em Pesquisa HC/FMRP/USP para início do estudo

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

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 10 de julho de 2013

Ofício nº 2520/2013
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“BUSCA DE CORRELAÇÕES ENTRE ALTERAÇÕES DA RESPOSTA IMUNE EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA TUBERCULOSE PULMONAR COM MUDANÇAS EPIGENÉTICAS”** foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 3 modificada em 26/06/2013** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle, Versão 3 modificada em 26/06/2013**, de acordo com o Processo HCRP nº 6481/2013.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

**Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP**

Ilustríssimas Senhoras

FABIANA ALBANI ZAMBUZI

PROFª DRª FABIANI GAI FRANTZ (Orientadora)

Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – FMRP-USP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Morite Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO II – Termo de Consentimento Controles

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “BUSCA DE CORRELAÇÕES ENTRE ALTERAÇÕES DA RESPOSTA IMUNE EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA TUBERCULOSE PULMONAR COM MUDANÇAS EPIGENÉTICAS”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Fabiana Albani Zambuzi

Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz

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 Medicina de Ribeirão Preto/USP em conjunto com os pesquisadores do Hospital das Clínicas com o objetivo de avaliar as alterações na função das células e em proteínas associadas ao DNA de células do sangue, chamadas monócitos, de pacientes infectados com *M. tuberculosis*. A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, 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. Caso não queira participar, o seu atendimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento.

O que são monócitos?

Os monócitos são células de defesa do corpo importantes para combater diversos germes capazes de causar doenças.

O que é Epigenética?

São alterações que ocorrem nas proteínas ligadas ao DNA, que podem ser transmitidas de pais para filhos e regulam a informação que será gerada a partir dos nossos genes. O estudo dessas alterações é muito importante para entendermos como o vírus interfere no nosso sistema imunológico e como podemos melhorar futuramente o tratamento dos pacientes infectados.

Como você, saudável, vai contribuir com a 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. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado. A qualquer momento da pesquisa, o participante poderá entrar em contato com os pesquisadores através dos telefones abaixo a fim de obter qualquer tipo de esclarecimento. Não haverá despesa ou qualquer tipo de remuneração ao participante.

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, tratamento e prevenção da doença. Para tal propósito, a pesquisa busca alterações epigenéticas que possam estar relacionadas à resposta do indivíduo frente o desenvolvimento da tuberculose, buscando entender o que faz o agente infeccioso desenvolver no indivíduo a doença ativa ou sua forma latente. Dessa forma, para a realização deste trabalho, precisamos de amostras de sangue de pessoas saudáveis (não contaminados com a bactéria causadora da tuberculose, nem outras infecções virais e fúngicas). 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 doentes.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, sendo os benefícios referentes aos dados obtidos que podem ser utilizados para identificar novos marcos da doença e assim beneficiar o diagnóstico, o tratamento e a prevenção. Fica a critério do mesmo a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Fabiana pelos telefones: (16) 3602-4189 ou (17) 8205-5000.

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 40 ml do meu sangue da veia do braço esquerdo para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade desta pesquisa é entender como alterações no padrão de resposta imunológica estão relacionadas com o tipo de apresentação clínica da doença no hospedeiro. Também autorizo a realização do teste de reatividade contra o bacilo (PPD) para detecção de resposta contra o agente causador da tuberculose

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do paciente – Registro

Fabiana Albani Zambuzi
Pesquisadora Responsável

ANEXO III – Termo de Consentimento Pacientes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “BUSCA DE CORRELAÇÕES ENTRE ALTERAÇÕES DA RESPOSTA IMUNE EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA TUBERCULOSE PULMONAR COM MUDANÇAS EPIGENÉTICAS”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Fabiana Albani Zambuzi

Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz

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 Medicina de Ribeirão Preto/USP em conjunto com os pesquisadores do Hospital das Clínicas com o objetivo de avaliar as alterações na função das células e em proteínas associadas ao DNA de células do sangue, chamadas monócitos, de pacientes infectados com *M. tuberculosis*. A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, 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. Caso não queira participar, o seu atendimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento.

O que são monócitos?

Os monócitos são células de defesa do corpo importantes para combater diversos germes capazes de causar doenças.

O que é Epigenética?

São alterações que ocorrem nas proteínas ligadas ao DNA, que podem ser transmitidas de pais para filhos e regulam a informação que será gerada a partir dos nossos genes. O estudo dessas alterações é muito importante para entendermos como o vírus interfere no nosso sistema imunológico e como podemos melhorar futuramente o tratamento dos pacientes infectados.

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. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado. A qualquer momento da pesquisa, o participante poderá entrar em contato com os pesquisadores

através dos telefones abaixo a fim de obter qualquer tipo de esclarecimento. Não haverá despesa ou qualquer tipo de remuneração ao participante.

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 biomarcador que ajude no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. Para tal propósito, a pesquisa busca alterações epigenéticas que possam estar relacionadas à resposta do indivíduo frente o desenvolvimento da tuberculose, buscando entender o que faz o agente infeccioso desenvolver no indivíduo a doença ativa ou sua forma latente, ou seja, infectado pelo bacilo, mas sem sinais clínicos de tuberculose – estado dormente. A coleta de sangue deverá ser feita em indivíduos PPD positivos, que serão divididos em dois grupos, o primeiro denominado TB latente que corresponde aos voluntários saudáveis com teste positivo e o segundo de TB ativa não tratada identificados através de sinais clínicos ou radiológicos confirmados por resultados microbiológicos, sem terem dado início ao tratamento. Os sinais clínicos incluem tosse, febre, expectoração, sudorese noturna, perda de peso e dor torácica com duração de 4 semanas ou mais, desde que **NÃO ESTEJAM INFECTADOS** por fungos e bactérias oportunistas.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, sendo os benefícios referentes aos dados obtidos que podem ser utilizados para identificar novos marcos da doença e assim beneficiar o diagnóstico, o tratamento e a prevenção, ficando a critério do mesmo a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Fabiana pelos telefones: (16) 3602-4189 ou (17) 8205-5000.

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 40 ml do meu sangue da veia do braço esquerdo para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade desta pesquisa é entender como alterações no padrão de resposta imunológica estão relacionadas com o tipo de apresentação clínica da doença no hospedeiro. Também autorizo a realização do teste de reatividade contra o bacilo (PPD) para detecção de resposta contra o agente causador da tuberculose

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do paciente – Registro

Fabiana Albani Zambuzi
Pesquisadora Responsável

ANEXO VI**Análise da pureza de células CD14+ após isolamento utilizando sistema de separação imunomagnética**

Figura A: *Dot plot* representativo da pureza obtida durante os experimentos realizados. Ao considerar todos os eventos adquiridos (A), foi observada a presença de 90,6% de monócitos (P1). (B) Ao avaliar a expressão de CD14 nas células presentes na *gate* de monócitos (P1), o número de células CD14+ foi superior à 98% (P3).