

Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira

Efeito da terapia antituberculose na expressão dos receptores
TLR-2 e 4, do fator de transcrição Foxp3, da Óxido Nítrico
Sintase Induzível, no perfil de citocinas e nas alterações
genotóxicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"- UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa Dra Sueli Aparecida Calvi

Botucatu/SP

2012

Oliveira, Larissa Ragozo Cardoso de.

Efeito da terapia antituberculose na expressão dos receptores TLR-2 e 4, do fator de transcrição Foxp3, da Óxido Nítrico Sintase Induzível, no perfil de citocinas e nas alterações genotóxicas / Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Sueli Aparecida Calvi

Capes: 21104000

1. Tuberculose - Tratamento. 2. Aparelho respiratório – Doenças – Tratamento. 3. Resposta imune.

Palavras-chave: Antioxidantes; Citocinas; Danos de DNA; Foxp3; iNOS; Tratamento; Tuberculose, receptores TLRs.



Dedicatória

“Eu aprendi...

... que a melhor sala de aula do mundo está aos pés de uma pessoa mais velha;

... que ser gentil é mais importante que estar certo;

... que é o amor; e não o tempo, que cura as feridas;

... que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo o que Lhe pedimos;

...que ignorar os fatos não os altera;

... que cada pessoa que a gente conhece deve ser saudada com um sorriso;

... que ninguém é perfeito até você se apaixonar por esta pessoa;

... que algumas vezes tudo o que precisamos é de uma mão para segurar e de um coração para nos entender;

... que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa é me cercar de gente mais inteligente que eu;

... que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a;

... que são os pequenos acontecimentos diários que tornam a vida espetacular; ...”

(William Shakespeare)

A toda minha família, em especial, aos meus pais Nelsi e Cardoso, à minha avó Estela e ao meu irmão Lucas

Dedico

Pneumotórax

Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.

A vida inteira que podia ter sido e que não foi.

Tosse, tosse, tosse.

Mandou chamar o médico:

- Diga trinta e três.
- Trinta e três... trinta e três... trinta e três...
- Respire.

- O senhor tem uma escavação no pulmão esquerdo e o pulmão direito infiltrado.
- Então, doutor, não é possível tentar o pneumotórax?
- Não. A única coisa a fazer é tocar um tango argentino.

(Manuel Bandeira)

Aos pacientes e voluntários que aceitaram em participar
desta pesquisa.

Dedico



Agradecimientos

A Deus, simplesmente, por tudo que me concedeu!

Aos meus pais amados, em quem me espelho, exemplos de caráter e dignidade, que sempre me ensinaram e mostraram, com muito amor e dedicação, o caminho a seguir, proporcionando todos os meios para minhas conquistas. Esta também é vocês!

Ao meu irmão Lucas, minha sobrinha Ana Luiza, minha avó Estela. Motivos de meu orgulho e admiração... amo vocês!

Aos meus tios, Hélio e Ligia, minhas primas Cristina e Carolina, enfim, toda minha família ... amo vocês!!

Ao meu namorado Fred. Obrigada pelo apoio ,motivação, compreensão. Amo você.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sueli Aparecida Calvi, exemplo de profissional e pessoa, por me oferecer oportunidades de crescimento e acreditar no meu trabalho. Obrigada pela amizade, orientação, incentivo, dedicação e disponibilidade sempre!

À minha companheira de trabalho, Eliana Peresi, por todas dificuldades superadas, pelas aventuras vividas, por vivenciar profundamente este trabalho comigo e pelo aprendizado.

Amigos da pós graduação, Mariana Gatto, Mariana Miziara, Fernanda, Francilene, Thales, Glaucia, Daniela, Tatiane, Adriele, Priscila, James. Obrigada pelo convívio, amizade, ajuda e momentos de descontração!

Aos funcionários da Enfermaria de Moléstias Infecciosas "Domingos Alves Meira", do Ambulatório de Moléstias Infecciosas, à Dra Luana., do Centro de Saúde Escola, pela simpatia com que sempre fui recebida e por estarem sempre prontos a me auxiliar no recrutamento dos pacientes.

Ao amigos Carlos Roberto Gonçalves de Lima e Thalísia. A cumplicidade, carinho e amizade de vocês.

À Marjorie e Léia, do Laboratório de Citometria de Fluxo, do Hemocentro de Botucatu, que sempre me receberam de braços abertos e foram sempre muito pacientes! O crescimento pessoal e científico durante este período é evidente!

À João Pessoa de Araújo Junior, pelo desprendimento em nos abrir as portas do Laboratorio de Virologia.

À amigos que estão sempre por perto e aos que seguiram outros rumos, mas estão sempre em meu pensamento. Tenham certeza que os tenho em mim, aprendi muito com vocês.

Ao departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem-Fauldade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Beto, da Comissão de Ética, à Juliana e todo o pessoal do GAP pela gentileza e boa vontade! Obrigada pelo apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo nº 2009/54800-2) e por viabilizar a realização deste estudo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho!

E principalmente aos pacientes e voluntários que aceitaram em participar dessa pesquisa. Espero que os resultados possam contribuir de alguma forma para aprimorar o conhecimento sobre a Tuberculose.

Muito obrigada!



Επίγραφε

Eu tenho uma espécie de dever,
dever de sonhar, de sonhar sempre,
pois sendo mais do que um espetáculo de mim mesmo,
eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso.

E, assim, me construo a ouro e sedas,
em salas supostas, invento palco,
cenário para viver o meu sonho
entre luzes brandas e
músicas invisíveis.

(Fernando Pessoa)



Resumo

A tuberculose permanece como um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. Tem como principal agente o *Mycobacterium tuberculosis*, e é uma doença letal sem tratamento, e seu controle é dificultado pela longa duração e ausência de marcadores, para medir o sucesso ou a falha deste. Os TLRs são receptores que após o reconhecimento de produtos microbianos, ativam a resposta inata e adaptativa. Assim, os receptores TLRs e as citocinas possuem um papel chave na defesa contra o bacilo. Considerando a ausência de informações na literatura em relação à resposta imune de pacientes com tuberculose pulmonar durante o tratamento antituberculose, principalmente em relação à interação inicial do *M. tuberculosis* com as células da imunidade inata e de seu papel, na indução da resposta adaptativa, através dos receptores TLR, estudos neste sentido, são necessários para se compreender melhor como é a resposta imune do hospedeiro contra o bacilo, frente ao tratamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos receptores TLR2 e TLR4, do fator de transcrição Foxp3 e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produção e expressão de citocinas, e alterações genotóxicas em pacientes durante o tratamento antituberculose. Foram coletadas amostras de sangue total dos controles saudáveis PPD⁺ em um único momento (G1) e de pacientes (G1) em três momentos diferentes: M1: início; M2: terceiro mês e M3: ao sexto mês de tratamento antituberculose. Após a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), as concentrações celulares foram ajustadas para a realização da qPCR, da citometria de fluxo e do teste do cometa. Pacientes com tuberculose pulmonar apresentaram expressão gênica, e na superfície celular de linfócitos e monócitos, de TLR2 e TLR4 maiores do que os indivíduos controles, tanto em M1, M2 e M3. Entretanto, a expressão e na superfície celular do receptor TLR2 foi maior que de TLR4. Níveis elevados de IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β e expressão gênica de Foxp3 foram observados durante todo o tratamento antituberculose. Produção e expressão de IL-10 e IL-17 apresentaram-se menores em pacientes com TB do que nos controles em M1, e após o início do tratamento houve aumento dessas citocinas em pacientes. A expressão gênica da enzima iNOS esteve diminuída durante todo o tratamento dos pacientes, quando comparada aos controles, tendendo a aumentar gradativamente. Além disso, pacientes também induziram elevados danos no DNA em células do sangue periférico, e resposta antioxidante. Nossos resultados sugerem que pacientes com TB pulmonar apresentaram alterações genotóxicas, provavelmente devido ao stress oxidativo, e que o tratamento antituberculose modulou a

resposta imune, induzindo aumento de receptores TLR e citocinas pró e antiinflamatórias, para combater a bactéria e diminuir o processo inflamatório.

Palavras-chave: Tuberculose, receptores TLRs, citocinas, Foxp3, iNOS, antioxidantes, danos de DNA



Abstract

Abstract

Tuberculosis (TB) remains a major public health problem in Brazil and worldwide. Its main agent *Mycobacterium tuberculosis*, and is a lethal disease without treatment, and its control is hampered by the long duration and lack of markers to measure the success or failure of this. The TLRs are receptors that after the recognition of microbial products, activate innate and adaptive response. Thus, TLRs receptors and cytokine have a key role in defense against the bacillus. Considering the absence of information in the literature regarding the immune response of patients with pulmonary tuberculosis during antituberculosis treatment, especially in relation to the initial interaction of *M. tuberculosis* with the cells of innate immunity and its role in the induction of adaptive response through the TLR receptors, studies in this direction are needed to better understand how the host immune response against the bacillus, towards treatment. The objective of this study was to evaluate the expression of TLR2 and TLR4 receptors, the transcription factor Foxp3 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) production and expression of cytokines and genotoxic alterations in patients during TB treatment. Samples were collected from whole blood of healthy PPD + controls in a single moment (G1) and patients (G1) at three different moments: M1: start, M2, M3, and the third month, the sixth month of TB treatment. After obtaining the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and cell concentrations were adjusted to carry out the qPCR, flow cytometry and testing of the comet. Patients with pulmonary tuberculosis showed gene expression and cell surface of lymphocytes and monocytes from TLR2 and TLR4 greater than the control subjects, both in M1, M2 and M3. However, the expression and cell surface receptor TLR2 was greater than that of TLR4. Elevated levels of IL-12, IFN- γ , TFN- α , TGF- β and Foxp3 gene expression were observed throughout the tuberculosis treatment. Production and expression of IL-10 and IL-17 were lower in TB patients than in controls in M1, and after starting treatment there was an increase of these cytokines in patients. The enzyme iNOS gene expression was decreased during the treatment of patients compared to controls, tends to increase gradually. In addition, patients also induced higher DNA damage in peripheral blood cells, increased activity of antioxidant enzymes. Our results suggest that patients with pulmonary TB showed genotoxic alterations, probably due to oxidative stress, and that the anti-tuberculosis treatment modulates the immune response, inducing an increase in TLR receptors and proinflammatory and anti-inflammatory, to fight bacteria and reduce inflammation.

Keywords: Tuberculosis, TLRs receptors, cytokines, Foxp3, iNOS, antioxidants, DNA damage

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1.Introdução.....	17
1.1. Tuberculose	18
1.2. Resposta imune na tuberculose.....	19
1.3. Alterações genotóxicas	25
1.4. Justificativa.....	27
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivos gerais	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. Casuística e Métodos	30
3.1. Casuística.....	31
3.2. Métodos	31
3.2.1. Formação dos grupos de estudo.....	31
3.2.2. Diagnóstico da Tuberculose	32
3.2.3. Tratamento.....	33

3.2.4. Coleta de sangue	33
3.2.5. Obtenção de células mononucleares totais do sangue periférico	33
3.2.6. Quantificação da expressão gênica pela PCR em Tempo Real (qPCR)	34
3.2.7. Avaliação da expressão de TLR-2 e TLR-4 por citometria de fluxo	38
3.2.8. Avaliação da produção de citocinas plasmáticas.....	38
3.2.9. Alterações genotóxicas	38
3.2.10. Capacidade Antioxidante Total Hidrofílica (CATH) no plasma.....	39
3.2.11. Análise Estatística.....	40
Referências Bibliográficas.....	41
4. Artigos	54
4.1. Artigo 1.....	55
4.2. Artigo 2.....	85
4.3. Artigo 3.....	104

1. Introdução



1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de evolução crônica, tendo como agente etiológico, a bactéria intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). O bacilo se dissemina pelo ar através de gotículas de saliva expelidas pela tosse, fala ou espirros dos doentes ^(1,2). Assim, o contágio se dá com maior frequência pelas vias respiratórias, indo o bacilo se alojar principalmente nos pulmões, onde a presença do oxigênio favorece sua multiplicação, e a ligação do órgão com o meio externo facilita sua transmissão. A partir daí, espalha-se pela linfa ou pelo sangue para outras partes do organismo, principalmente para o ápice pulmonar e os linfonodos regionais. A tuberculose extrapulmonar, ocorre na pleura, sistema linfático, meninges, ossos, sistema geniturinário, meninges, peritônio ou pele ^(2,3). Fatores como o número de microrganismos expelidos, a concentração de microrganismos no ar, determinada pelo volume do espaço e a sua ventilação, o intervalo de tempo que a pessoa exposta respira o ar contaminado (≥ 8 horas), e o estado imunológico do indivíduo exposto, têm sido descritos como determinantes na transmissão do *M. tuberculosis* e adoecimento ⁽⁴⁾.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectado pelo bacilo, com 9,4 milhões de casos novos e 1,7 milhões de mortes devido à doença por ano. No Brasil, existem mais de 50 milhões de indivíduos infectados e cerca de oitenta mil casos novos por ano ^(5,6). Cerca de 5% a 10% dos infectados desenvolvem a doença. Entre os fatores que tentam explicar este fato, os que interferem na imunidade do hospedeiro, como a desnutrição, o etilismo, a idade avançada, aids, diabetes, entre outros ⁽³⁾. Entretanto, na maioria dos indivíduos infectados a micobactéria é destruída pelos macrófagos alveolares ou permanece na forma de infecção latente, podendo o bacilo permanecer por tempo indefinido, contido nas células de defesa. Durante o estado de latência o *M. tuberculosis* fica dormente, replicando e com metabolismo alterado, o que gera um reservatório enorme de micobactérias. Em uma minoria dos casos, desenvolve-se a doença ativa (tuberculose primária) preferencialmente no pulmão, embora possa atingir qualquer tecido do organismo após disseminação hematogênica. A destruição do bacilo depende inicialmente da capacidade microbicida intrínseca dos macrófagos alveolares, e dos fatores de virulência da micobactéria ^(7,8).

O diagnóstico precoce e o início de tratamento, são fundamentais para minimizar a transmissão e reduzir a morbidade e mortalidade da tuberculose. O diagnóstico presuntivo da tuberculose pulmonar se faz pelos dados clínicos e radiológicos. Atualmente, o diagnóstico de tuberculose ainda depende de exames microbiológicos, os quais requerem um manuseio

cuidadoso e um transporte rápido da amostra ⁽⁴⁾. O definitivo é feito pela baciloscopia e pela cultura do *M. tuberculosis* da amostra do paciente. A baciloscopia identifica os bacilos álcool-ácido resistente (BAAR) em esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen que é um método rápido e barato, mas que apresenta baixa sensibilidade. O método mais sensível e específico é o isolamento da micobactéria em cultura, no entanto, como a reprodução do bacilo é lenta, a definição do diagnóstico só é alcançado em quatro a oito semanas, tempo muito longo, que pode influenciar o controle da endemia ⁽⁹⁾. Portanto, a tuberculose é uma doença de difícil diagnóstico, principalmente por causa do crescimento lento deste organismo em meio de cultura. Uma avaliação completa para o diagnóstico inclui a história médica, radiografia do tórax, exame físico, microbiologia de biópsia e culturas ⁽¹⁰⁾.

A tuberculose é letal sem tratamento e este é fundamentalmente quimioterápico, o qual diminui drasticamente a mortalidade, reduz o período de transmissibilidade e, quando usado profilaticamente, previne o adoecimento, constituindo assim a ferramenta mais importante no controle da doença ⁽³⁾. Porém, por ter longa duração, aproximadamente seis meses, muitas vezes é interrompido pelo paciente facilitando o desenvolvimento de cepas resistentes a drogas ^(11,12). Existem atualmente quatro antimicrobianos de primeira linha: isoniazida, etambutol, pirazinamida e rifampicina, que são razoavelmente efetivos no tratamento de indivíduos com tuberculose ativa, porém, ineficientes durante o estágio latente da doença ^(13,14). De uma maneira geral, as drogas antituberculose atuam por interferência enzimática ou bloqueio na síntese protéica. Podem ser bactericidas ou bacteriostáticas, intra ou extracelulares, dependendo de como agem sobre os bacilos com maior ou menor poder de esterilização, relacionados à rapidez e à amplitude com que atuam sobre as diversas populações bacilíferas ⁽³⁾. Entretanto, mais de 50 milhões de pessoas no mundo já se encontram infectadas com cepas multirresistentes às drogas (CMR), e 15% dos casos de TB são causadas por essas cepas ⁽¹⁵⁾. A mortalidade pelas CMR é de 40% a 60%, que equivale a doentes não tratados ⁽¹⁶⁾.

1.2. Resposta imune na tuberculose

O reconhecimento inicial de microrganismos é mediado por receptores celulares expressos em células da imunidade inata. Entre esses receptores destacam-se os receptores semelhantes à toll (TLRs, toll-like receptors), através dos quais as células são capazes de reconhecer microrganismos com conseqüente regulação da fagocitose, da atividade

microbicida, produção de citocinas, diferenciação de célula dendríticas imaturas, capacitando o sistema imune a induzir resposta imune adaptativa^(17,18).

O receptor Toll foi originalmente identificado em *Drosophila melanogaster*, devido ao seu papel na determinação do padrão dorso-ventral durante a embriogênese da mosca. Mais tarde, observou-se que ele também participava na sinalização em resposta à infecção em moscas adultas. São expressos em várias células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, além de células não imunes como fibroblastos e células epiteliais⁽¹⁹⁾. Reconhecem certos constituintes microbianos denominados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Os PAMPs são produtos produzidos e conservados pelos microorganismos e não por células do hospedeiro, sendo essenciais para o seu metabolismo e sobrevivência⁽²⁰⁾. Os TLRs reconhecem, individualmente, um repertório distinto, mas limitado de PAMPs, tais como, glicolipídeos, LPS de bactérias Gram-negativas, lipopeptídeos e peptidoglicanos e outros componentes da parede celular microbiana⁽²¹⁾. O TLR-4 e LPS, TLR-5 e flagelina, TLRs-1/2/6 e lipoproteínas e TLRs-3/7/8/9 e diferentes ácidos nucleicos são exemplos de pares ligantes bem caracterizados⁽²¹⁾.

Os TLRs caracterizam-se por apresentar dois domínios, o domínio extracelular contém repetições ricas em leucina (LRR) e o domínio intracelular que, possui homologia ao receptor para interleucina 1, é chamado de Toll/IL-1R (TIR)^(22,23). Todo TLR sinaliza através da proteína adaptadora MyD88 (fator de diferenciação mielóide), que também contém um domínio Toll/IL-1R, resultando em translocação do fator de transcrição NF- κ B e subsequente transcrição de genes para citocinas pró inflamatórias. Além dessa via, uma via dependente de TRIF pode também ser ativada, a qual interage com TRAF 6 e RIF 1, mediando assim a ativação de NF- κ B⁽²⁴⁾. NF- κ B é o maior fator de transcrição e regulador pleiotrópico na expressão de muitos genes, tem a função de ligar-se à sequência alvo de DNA para iniciar a transcrição⁽²⁵⁾.

O reconhecimento do *M. tuberculosis* pelos TLRs na superfície celular é um determinante importante da eficácia da resposta imune do hospedeiro. Os produtos micobacterianos podem ser reconhecidos principalmente pelos TLRs 2/4, e a presença de seu DNA pelo TLR-9⁽²⁶⁾.

O TLR-2 é o principal receptor para os constituintes micobacterianos, reconhecendo a lipoarabinomanana (LAM), o seu precursor “phosphatidylinositol mannoside” (PIM) e a lipoproteína de 19-kDa⁽²⁷⁻³¹⁾. Este receptor está envolvido na resposta a micobactéria íntegra, podendo influenciar também seu processamento após a fagocitose pelos macrófagos⁽³²⁾. Além disso, a própria micobactéria possui a propriedade de induzir a expressão do TLR-2, através

do recrutamento deste receptor para o envelope fagossômico dentro dos MØs, apresentando este receptor como um sensor primário para o reconhecimento do microrganismo invasor ⁽³³⁾.

Estudos demonstram que o TLR-2 é responsável pela ativação intracelular e morte de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos e de camundongos. Em ambos os macrófagos, as lipoproteínas bacterianas ativam o TLR-2, ocorrendo a destruição intracelular do bacilo, através de um mecanismo dependente de NO. No caso dos macrófagos murinos a produção deste metabólito foi dependente de IFN- γ e TNF- α , enquanto que em células humanas estava relacionada com a produção de IL-12 ⁽³⁴⁾.

O TLR-4 não é um receptor apenas para ligantes exógenos, como o LPS de bactérias gram-negativas, podendo reconhecer ligantes endógenos, como fibronectina, proteínas do choque tóxico e oligossacarídeos hialurônicos ⁽³³⁾. Os ligantes do *M. tuberculosis* para este receptor ainda não são bem conhecidos, mas um estudo recente demonstrou que a via de sinalização da proteína micobacteriana de choque térmico 65 é exclusivamente através do TLR-4 ⁽³²⁾. Além disso, foi comprovado que o BCG induziu a transcrição da quimiocina CXCL8 em neutrófilos humanos através dos TLRs-2/4, em conjunto com a proteína MyD88 ⁽³⁴⁾. Em outro estudo, a glicoproteína de 38-kDa, purificada do *M. tuberculosis*, induziu a ativação de proteínas kinases via TLR-2/4 e a subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 em monócitos humanos. A relação entre TLR4 e a susceptibilidade ao *M. tuberculosis* parece ser dependente da dose do bacilo. Experimentos que utilizaram baixas concentrações do *M. tuberculosis*, mostraram que na ausência do TLR-4, a resistência à tuberculose não foi comprometida, enquanto que doses elevadas do *M. tuberculosis* aumentaram a suscetibilidade, na ausência da sinalização pelo TLR-4 ⁽³⁴⁾.

Uma das características dos microrganismos intracelulares, como é o caso do *M. tuberculosis*, é a sua capacidade de sobreviver e mesmo se replicar dentro dos fagócitos, tornando-se inacessíveis aos anticorpos circulantes, sendo que sua eliminação requer a interação de várias populações celulares imunocompetentes, principalmente de macrófagos e linfócitos T, caracterizando como o principal mecanismo de resposta imune contra este agente, a imunidade mediada por células ^(35,1).

O mecanismo de defesa inicial contra o *M. tuberculosis* envolve a fagocitose do microrganismo por macrófagos alveolares. Após este processo, ocorre produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas, que impulsiona desenvolvimento de uma resposta Th1 para produção de IFN- γ ^(36,37). A IL-12 é crucial contra o *M. tuberculosis*, fazendo uma ligação entre imunidade inata e adaptativa, induz células NK e células Th1 a produzirem IFN- γ , o

qual por sua vez ativa macrófagos levando a produção de TNF- α e aumentando sua atividade microbicida. Assim, em resposta a IL-12, as células NK proporcionam uma defesa inicial contra esses microrganismos antes do desenvolvimento completo da imunidade adaptativa⁽³⁸⁾. Estudo utilizando a administração precoce de IL-12 em camundongos BALB/c infectados com *M. tuberculosis*, resultou em diminuição da carga bacteriana e aumento da sobrevivência dos animais⁽³⁹⁾. Por outro lado, IL-12 teve apenas efeitos marginais sobre o número de bactérias em camundongos C57BL/6, talvez isto reflita o fenótipo naturalmente mais resistente desta espécie, comparado ao BALB/c⁽⁴⁰⁾.

O IFN- γ , produzido pelos linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK^(41,42) é uma citocina exigida para a atividade lítica de macrófagos alveolares/monócitos contra o *M. tuberculosis*, que passam a produzir reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio envolvidos na inibição do crescimento e morte da micobactéria, e IL-12, levando a uma retroalimentação positiva que amplifica essa via⁽⁴³⁻⁴⁶⁾. A importância do IFN- γ para infecções micobacterianas humanas foi demonstrada em indivíduos com genes defeituosos para produção de IFN- γ , ou no receptor desta citocina, os quais foram mais propensos a sérias infecções micobacterianas, incluindo o *M. tuberculosis*. Estudos têm mostrado o aumento de IFN- γ em pacientes com TB ativa⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. De fato, um estudo demonstrou que o *M. tuberculosis* pode impedir macrófagos de responder adequadamente ao IFN- γ ⁽⁵⁰⁾.

Outra citocina envolvida na tuberculose é o TNF- α . O *M. tuberculosis* induz secreção desta citocina por macrófagos, células dendríticas, e células T^(36,37,51,42). Esta citocina é necessária para o controle da infecção aguda pelo *M. tuberculosis*, devido ao seu papel na inflamação local e na ativação de macrófagos, sendo essencial para a formação e manutenção do granuloma^(52, 15,43). Em camundongos deficientes de TNF- α ou de seu receptor de 55 kDa, a infecção pelo *M. tuberculosis* resultou em morte rápida dos animais, com carga bacteriana mais elevada, quando comparado à dos animais controles^(53,54). Camundongos infectados pelo *M. tuberculosis* e tratados com anticorpo anti-TNF- α , resultou em 100% de mortalidade e o número de bactérias nos pulmões aumentou. O exame histológico revelou que os pulmões dos camundongos tratados com anticorpo anti-TNF- α apresentaram patologia grave, com granulomas desorganizados, infiltrações celulares difusas, exsudados alveolares e, em alguns casos, metaplasia escamosa. Assim, TNF- α apresentou um importante papel como um modulador de inflamação nesta infecção⁽⁵⁵⁾. O TNF- α em sinergia com IFN- γ , induz a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Em camundongos deficientes de iNOS, ocorreu elevada replicação do *M. tuberculosis* quando comparados aos

animais normais, demonstrando a importância do NO na defesa do hospedeiro contra a micobactéria^(1, 59, 2, 60). Apesar da ação dos vários mecanismos de defesa, o *M. tuberculosis* sobrevive e se multiplica no macrófago, ativando linfócitos T, o que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ , o TNF- α e a formação do granuloma típico, com necrose central caseosa, causada pela ação de enzimas lisossômicas que lesam o tecido. A área de necrose caseosa é circundada por células mielóides, células gigantes multinucleadas e linfócitos T CD4+ e T CD8+. A medida que a área se solidifica, o bacilo, antes visível, desaparece e a lesão calcifica e é reabsorvido, ou permanece em estado de liquefação^(61,62, 52, 63). O *M. tuberculosis* se replica exponencialmente nestas áreas de necrose liquefeita. Se ocorrer a ruptura da lesão para as vias aéreas, os bacilos podem atingir outras áreas do próprio pulmão infectado, ou serem expelidas para o ambiente, infectando novos indivíduos^(1, 64-69).

Estudos têm sugerido que a imunidade protetora ao *M. tuberculosis* requer, além das células Th1, de células Th17. A diferenciação das células Th17 é iniciada pela ativação de células T naive, na presença de IL-6, IL-21 e baixas quantidades de TGF- β . A sinalização conjunta dessas citocinas em células T induz a expressão do receptor nuclear ROR γ t através de STAT-3. STAT-3 e ROR γ t induzem a expressão do receptor para IL-23, resultando na sinalização subsequente desta citocina, que então estabiliza o fenótipo Th17^(70,71). Estas células apresentam importantes funções pró-inflamatórias e são definidas pela produção das citocinas IL-17A a IL-17F^(72,73). Tanto a IL-17 A quanto a IL-17F apresentam propriedades pró-inflamatórias, induzindo a expressão de citocinas (IL-6, IL-8, GM-CSF e G-CSF), quimiocinas (CXCL1, CXCL10) e metaloproteinases, importantes no recrutamento, ativação e migração de neutrófilos⁽⁷⁴⁾. Alguns estudos têm sugerido o papel da IL-17 na proteção do hospedeiro contra alguns patógenos específicos, incluindo o *M. tuberculosis*⁽⁷⁰⁾. Células dendríticas, após a interação com a micobactéria, produzem IL-12 e IL-23 que atuam de forma sinérgica para produção de IL-17⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾. Estudos sugerem que o recrutamento de neutrófilos e quimiocinas é provavelmente, um dos mecanismos pelo qual o eixo IL-23/Th17 promove a integridade do granuloma na fase aguda da infecção, independentemente da resposta protetora⁽⁷⁰⁾. Entretanto, em uma fase mais tardia da infecção, alguns estudos têm sugerido que a resposta Th17 é altamente patológica, causando acentuado dano tecidual, pelo acúmulo de células produtoras de IL-17 no local da infecção, dependentes da expressão de IL-23 para manutenção desta resposta⁽⁷⁰⁾.

A constante produção de citocinas inflamatórias essenciais, como IFN- γ , e TNF- α , assim como outros produtos bactericidas, incluindo os reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio, gerados pelos macrófagos e células efetoras imunes, parece ser o fator chave para

a latência do *M. tuberculosis* no granuloma. ^(79,80). O controle dos rumos da infecção se deve principalmente à deficiência do IFN- γ , e as formas mais graves da tuberculose estão associadas ao aumento de IL-4 e de TGF- β , que suprimem a proliferação linfocitária e direcionam para o perfil Th2 ^(81,82). Entretanto, apesar do efeito protetor da resposta Th1 contra a tuberculose, a elevada expressão de algumas citocinas, como o TNF- α , está relacionada com a imunopatogênese da doença ^(61,83). Para limitar esta ação deletéria, surgem os mecanismos antiinflamatórios, representados pelos receptores solúveis de TNF- α , que impedem a ligação dessa citocina ao seu receptor, por bloqueio da sinalização, pelas células T regulatórias e pelas citocinas antiinflamatórias, IL-4, IL-10 e TGF- β ^(81, 83,84).

As células T regulatórias (Treg) constituem um componente chave para a tolerância periférica, suprimindo células autoreativas e desenvolvendo um papel crítico no controle da intensidade da resposta imune nas infecções. Estas células inibem a proliferação e/ou a produção de citocinas por outras células. Esta capacidade supressora requer o contato célula-célula e/ou produção de citocinas inibitórias, tais como, IL-10 ou TGF- β . As Treg expressam marcadores de superfície como o CD25+, e o fator de transcrição nuclear Forkhead box P3 (FoxP3), o qual parece ser fundamental para o desenvolvimento e função desta capacidade supressora, sendo o marcador molecular mais específico ⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾.

A IL-10 produzida por macrófagos e células Treg durante a infecção pelo *M. tuberculosis*, atua inibindo a proliferação das células e a produção de IFN- γ , dessa maneira desativa macrófago, modulando as citocinas pró-inflamatórias e diminuindo a função apresentadora de antígenos da célula ⁽⁸⁸⁾. A IL-10 inibe diretamente as respostas de células T CD4+, bem como a função das células apresentadoras de antígenos (APCs) infectadas com micobactérias ⁽⁷⁹⁾. Como citocina antiinflamatória, a IL-10 relaciona-se ao aumento da gravidade da doença, pela inibição da resposta imune protetora. Previne danos teciduais, pela regulação da inflamação e da apoptose, tendo efeito contrário ao do TNF- α . Sua produção pelos macrófagos é estimulada por componentes da parede celular micobacteriana ⁽⁸⁹⁻⁹³⁾.

O TGF- β , citocina produzida por linfócitos Treg, macrófagos e células dendríticas, tem sido implicado na supressão do perfil Th1 e também participa na indução da fibrose em modelos experimentais de infecção pulmonar, e em lesões granulomatosas de pacientes com tuberculose, induzidas pela inflamação em resposta ao *M. tuberculosis*. ⁽⁹⁴⁻⁹⁷⁾. Apresenta ação pró e antiinflamatória, dependendo de sua concentração ⁽⁸¹⁾. Em baixas concentrações, atua como fator quimiotático para monócitos e induz a secreção de interleucina-1 α (IL-1 α) e TNF- α ⁽⁹⁸⁾. O TGF- β , em alta concentração, durante a fase crônica da tuberculose inicia um

processo antiinflamatório e de regeneração, desativa macrófagos, inibe a expressão e funcionamento de receptores para IFN- γ , IL-1 α e IL-2 e diminui a produção do TNF- α , eventos paralelamente relacionados com aumento do crescimento micobacteriano intracelular. Além disto inibe a proliferação de células TCD4⁺, induz a expressão de receptores CD8 e aumenta a produção de citocinas do perfil Th2, como IL-10. Rojas *et al.* ⁽⁹⁹⁾, estudando células TCD4⁺ ativadas pelo *M. tuberculosis*, não observaram efeito sinérgico entre TGF- β e IL-10. Relatam, no entanto, inibição da resposta das células TCD4⁺ ao *M. tuberculosis* por ambas citocinas, porém, por diferentes mecanismos de ação. Hirsch *et al.* ⁽¹⁰⁰⁾, empregando cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos com tuberculose, observaram aumento significativo na produção de IFN- γ , na presença de anticorpos anti-TGF- β , comprovando o efeito imunomodulador dessa citocina.

1.3. Alterações genotóxicas

Outro aspecto a ser considerado, e que também poderia estar associado à infecção pelo *M. tuberculosis*, é a possibilidade de mutações no DNA, que podem decorrer de alterações na resposta imune, e responsáveis pelo aumento à susceptibilidade a transformações malignas ⁽¹⁰¹⁾. Estima-se que 8% a 17% de todos os casos de cancer sejam causados por infecções crônicas por vírus como o vírus do papiloma, da hepatite C, mas também por parasitas e bactérias, como, *Opisthorchis viverrini*, *Helicobacter pylori* e *Mycobacterium tuberculosis*. ⁽¹⁰²⁾. A carcinogênese associada à infecções é um processo complexo, muitas vezes mediado por condições inflamatórias crônicas, evidências indicam que uma inflamação latente é um componente do microambiente do tumor. Alguns estudos constataram a presença de danos genéticos na tuberculose ⁽¹⁰¹⁾. Rao *et al.* ⁽¹⁰¹⁾, observaram aumento na frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de pacientes com tuberculose não tratados. D' Sousa & Das ⁽¹⁰³⁾, estudando os efeitos genotóxicos da infecção com o *Mycobacterium leprae*, observaram que os danos no DNA podem ser proporcionais à gravidade da doença, e que o tratamento aumentou significativamente este processo, quando comparado aos pacientes não tratados. Esses resultados sugerem que tanto a infecção bacteriana quanto a terapia com drogas são fatores causadores de danos no DNA ⁽¹⁰⁴⁾. Além disso, a coexistência de tuberculose pulmonar e carcinoma foram descritos inicialmente por Bayle em 1810. Assim, uma associação de carcinoma de células escamosas metastático do pulmão com lesões de TB cavitária tem sido demonstrada ^(105, 106).

A tuberculose pulmonar ocorre principalmente em adultos imunocompetentes, sendo um processo infeccioso crônico associado com intenso remodelamento tecidual pulmonar. O principal mecanismo envolvido neste processo é a formação do granuloma contendo a bactéria viva, assim como células linfóides e mielóides. A formação e manutenção do granuloma são mediadas por resposta imune ativa, ocorrendo a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios. A subsequente ativação de macrófagos por citocinas e produtos micobacterianos resulta em elevada produção local de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prostaglandinas, proteases e citocinas inflamatórias⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾. Este processo pode causar⁽¹⁰⁶⁾ dano intenso no tecido do hospedeiro, podendo estar associado a um dano genômico. D'souza & Das⁽¹⁰³⁾, relataram que o *M. leprae* desencadeou produção de radicais de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, por neutrófilos presentes no sangue de indivíduos infectados, que exerceram atividade genotóxica. Em pacientes com tuberculose pulmonar ativa foi observada associação entre stress oxidativo e danos no DNA⁽¹¹⁰⁾. Na infecção experimental causada pela *L. chagasi* e pelo *T. cruzi*, os danos de DNA detectados em células esplênicas foram correlacionados com elevada produção de NO^(111,112). O acúmulo de danos no DNA, ao longo do tempo, pode levar a modificações em células que podem se tornar alterações mutagênicas ou carcinogênicas⁽¹¹³⁾. O ensaio do cometa (single-cell gel electrophoresis) é um método utilizado para avaliar alterações genotóxicas e lesões primárias no DNA. É um método rápido, simples e sensível para determinar os níveis de dano no DNA em diversas situações⁽¹¹¹⁾.

1.4. Justificativa

Entre as doenças infecciosas que atingem a humanidade, a tuberculose, apesar dos esforços para sua eliminação, permanece como um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. Seu desenvolvimento depende de uma relação complexa entre o homem e o bacilo e vários mecanismos moleculares estão envolvidos na sua suscetibilidade. Após o diagnóstico, é importante o acompanhamento do doente em tratamento até a obtenção da cura, que por ser longo pode levar ao abandono pelo paciente, favorecendo o aparecimento de cepas multirresistentes do bacilo. Os receptores TLRs e as citocinas possuem um papel chave na defesa contra do bacilo. Considerando a ausência de informações na literatura em relação à resposta imune de pacientes com tuberculose pulmonar durante tratamento antituberculose, principalmente em relação à interação inicial do *M. tuberculosis* com as células da imunidade inata, através dos receptores TLRs, e do papel deste receptor na indução da resposta adaptativa, acreditamos, assim ser relevante a avaliação dos receptores TLR, da produção de citocinas, da expressão da iNOs e do fator de transcrição FoxP3 em pacientes com TB pulmonar submetidos ao tratamento antituberculose. Além disso, não existem relatos na literatura a respeito das alterações genotóxicas durante o tratamento antituberculose.

Os resultados deste estudo permitirão uma melhor compreensão da interação ente o *Mycobacterium* e o hospedeiro durante o tratamento antituberculose



2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento antituberculose na expressão dos receptores TLR2 e TLR4, do fator de transcrição Foxp3⁺, da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e no perfil de citocinas, assim como verificar a presença de alterações genotóxicas associadas com a expressão de iNOS e com a capacidade antioxidante total hidrofílica em pacientes com tuberculose pulmonar.

2.2. Objetivos específicos

Em pacientes com tuberculose no início do tratamento (M1), no terceiro mês de tratamento (M2) e no final dos seis meses de tratamento (M3):

2.2.1. Avaliar a expressão gênica dos receptores TLR2, TLR4, do fator de transcrição Foxp3⁺, da iNOS e das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-17, IL-10 e TGF- β , pela PCR em tempo real (qPCR), em células mononucleares do sangue periférico;

2.2.2. Avaliar a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 na superfície de células mononucleares do sangue periférico, através da citometria de fluxo;

2.2.3. Avaliar a produção de citocinas plasmáticas pelo método CBA, através da citometria de fluxo;

2.2.4. Verificar se pacientes com tuberculose pulmonar induzem alterações genotóxicas em células mononucleares do sangue periférico, através do teste do cometa;

2.2.5. Avaliar a capacidade antioxidante total hidrofílica (CATH) no plasma;



3. Casuística e Métodos

3.1. Casuística

Neste estudo foram coletadas amostras de 31 pacientes com tuberculose pulmonar, atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Centro de Saúde Escola de Botucatu, Unidades Básicas de Saúde de Botucatu, Avaré, Conchas, Itaí, Santa Maria da Serra, Paranapanema, São Manuel e Itatinga. Como controles normais, foram coletadas amostras de 20 indivíduos saudáveis, voluntários, profissionais da saúde com teste tuberculínico positivo (PPD+). O teste do PPD consiste na injeção intradérmica de 0,1 ml (2U) do derivado de proteína purificado. Enduração ≥ 5 mm, medido após 72 hs foi considerado positivo. O PPD foi aplicado por profissional devidamente habilitado. O valor médio do PPD para o grupo controle foi de 10 mm.

Foram incluídos apenas os pacientes e controles que concordaram em participar do estudo, após o devido esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2. Métodos

3.2.1. Formação dos grupos de estudo

Foram formados dois grupos:

Grupo 1 (G1): grupo controle, constituído por 20 indivíduos, sem queixas clínicas de tuberculose pulmonar, profissionais da área de saúde do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp, com PPD+ (≥ 5 mm).

Grupo 2 (G2): formado por 31 pacientes com tuberculose pulmonar. Neste grupo todas as variáveis foram determinadas em três momentos: **M1-** com até um mês de tratamento antituberculose; **M2-** no terceiro mês de tratamento; **M3-** ao final dos seis meses de tratamento. As amostras de sangue foram obtidas de:

- 28 pacientes em M1;
- 24 pacientes em M2;
- 21 pacientes em M3;

- 19 pacientes seguidos com todos os momentos (M1+M2+M3);

Critérios de Inclusão: Idade maior ou igual a 18 anos, ambos os sexos, diagnóstico de tuberculose pulmonar comprovado por baciloscopia ou culturas positivas para *M. tuberculosis* ou, então, por quadro clínico-epidemiológico, exames laboratoriais e de imagem compatíveis com tuberculose em atividade.

Critérios de Exclusão: foram excluídos todos os pacientes com tuberculose pulmonar concomitante à outra doença granulomatosa em atividade ou à sorologia positiva para HIV, mulheres grávidas, doenças auto-imunes, TB extra-pulmonar, com outras imunodeficiências e cancer.

3.2.2. Diagnóstico da Tuberculose

3.2.2.1. Baciloscopia

Foi realizada a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaços de amostras seriadas de escarro. Este procedimento foi feito na rotina da Seção de Microbiologia do Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

3.2.2.2. Exame Histopatológico

Determinação por exame histopatológico do bacilo álcool-ácido resistente, em material de lesão colhido por equipe médica, nos doentes atendidos na Enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, foi realizada no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

3.2.2.3. Exames de Imagem

Exames de imagem, como raio-X simples e tomografia computadorizada, fazem parte da rotina de conduta diagnóstica dos casos com suspeita de tuberculose, e foram realizados segundo indicação médica. Os exames de imagem foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

3.2.2.4. Marcadores inflamatórios

A determinação dos marcadores inflamatórios foi realizada no Laboratório Clínico e no Laboratório de Hematologia, ambos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

3.2.3. Tratamento

O tratamento antituberculose foi realizado nos doentes com doença confirmada por baciloscopia de escarro. Quando não se conseguiu demonstrar o bacilo, o tratamento foi introduzido nos pacientes com quadro clínico-epidemiológico e de imagem sugestivos de tuberculose em atividade e com alteração dos marcadores inflamatórios, como as proteínas de fase aguda, indicativos de doença em atividade ou, ainda, com presença de granuloma em exame histopatológico. O tratamento dos pacientes foi realizado durante seis meses, com esquema padrão.

3.2.4. Coleta de sangue

Foram colhidas amostras de 20 ml sangue da veia do antebraço, em um único momento no grupo controle, e nos três momentos no grupo de doentes com tuberculose pulmonar. As amostras do sangue foram coletadas em tubos heparinizados e inicialmente foram centrifugadas a 1500 x g por 10 min para obtenção do plasma, para realização das dosagens das citocinas pelo CBA e CATH. As amostras restantes de sangue foram utilizadas para obtenção das células mononucleares do sangue periférico para posterior avaliação da expressão de TLR2, TLR4, Foxp3, IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β e alterações genotóxicas.

3.2.5. Obtenção de células mononucleares totais do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por meio da separação em gradiente de Histopaque^R (114). O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado com PBS 15 minutos a 1500 rpm. Após este período, a suspensão celular foi ressuspensa em PBS, sendo a identificação e viabilidade das mesmas realizadas pela contagem com reagente de Turk. A seguir, foi acertada a concentração da suspensão celular para 1×10^6 /ml, para realização da citometria de fluxo, ou para 2×10^6 /ml, para a realização dos demais protocolos.

3.2.6. Quantificação da expressão gênica dos receptores TLR2 e 4, das citocinas, da iNOS e do Foxp3+ pela PCR em Tempo Real (qPCR)

3.2.6.1. Extração de RNA

O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico obtidas segundo o item 3.2.5, 2×10^6 céls/ml foram colocadas em tubo com 500 ul de Trizol e homogeneizadas. Em seguida foram acrescentados 150 ul de clorofórmio na solução obtida, a qual foi homogeneizada durante 15 segundos. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por dez minutos e centrifugados por 15 minutos, a 12000 g à 4°C. A fase translúcida obtida foi transferida para um novo tubo contendo 300 ul de álcool isopropílico. Após homogeneização dos tubos em agitador as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos (12000 g 4°C) e o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado 1 ml de etanol 75% e a solução foi homogeneizada em agitador até a liberação do pellet da parede do tubo e, em seguida, centrifugada por 5 minutos, a 7500g à 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o tubo deixado em temperatura ambiente para secagem completa. O pellet foi resuspenso em 30 ul de água ultrapura e colocados a 56°C por 10 minutos. As amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C até o momento de uso.

As amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, para verificar a existência de contaminação com DNA, bem como a integridade do RNA extraído, que foi constatada pela presença das bandas 28s, 18s e 5s/5.8s rRNA (Fig 1)

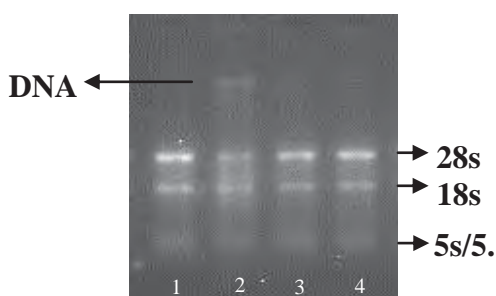


Fig. 1: Eletroforese de RNA

As concentrações e a integridade do RNA das amostras foram determinadas a partir dos valores de absorbância, dados pelo aparelho *NanoDrop® ND Spectrophotometer*, do laboratório de Biologia Molecular da Divisão Técnica do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A razão $A_{260/280}$ deve estar entre 1,8

e 2,0, o que demonstra a pureza do ácido nucléico. As amostras extraídas de G1 e G2 estão entre 1,8 e 2,18.

3.2.6.2. *Tratamento com DNase*

As amostras de RNA que apresentaram contaminação com DNA em gel de agarose, foram submetidas ao tratamento com DNase (Promega). Para cada 8 ul de amostra foram acrescentados 1 ul de DNase e 1 ul de tampão. As amostras foram incubadas à 37°C por 30 minutos. Após a incubação foi adicionado 1 ul de stop solution nas amostras as quais foram incubadas a 65°C por 10 minutos.

3.2.6.3. *Síntese de cDNA*

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 ug de RNA total, pelo Kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Para cada 1ug de RNA foi utilizado 1ul de random primer (Invitrogen), 1ul de 10 mM Mix dNTP (Invitrogen) e q.s.p. de água DEPC para um volume final de 13 ul. A mistura foi homogeneizada, rapidamente centrifugada e aquecida a 65°C por 5 minutos. Para cada amostra, foram adicionados 4 ul de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 1 ul de DTT (Invitrogen), 1 ul de RNaseOUT™ Recombinat RNase Inhibitor V e 1 ul de SuperScript™ III RT. A solução foi homogeneizada, rapidamente centrifugada e incubada nas seguintes condições da reação: 25°C por 5 minutos, 50°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos. Para remover o RNA complementar do cDNA, foi adicionado 1 ul (2unidades) de *E. coli* RNase H. O cDNA foi novamente incubado a 37°C por 20 minutos.

Foi sintetizada, em uma única vez, a quantidade suficiente de cDNA para a realização de todo o experimento. As amostras foram mantidas em freezer -80°C, até a utilização na PCR em tempo Real (qPCR).

3.2.6.4. *Padronização das curvas padrão para expressão de citocinas, dos receptores TLR 2 e 4, do Foxp3+ e da iNOS pela técnica de PCR e tempo real (qPCR).*

A fim de comprovar a eficiência da reação, os genes de cada citocina, dos receptores, Foxp3+, iNOS e o gene controle β -actina foram amplificados, em diluições seriadas (pura, 1:10, 1:100, 1:1000) em duplicata. As reações utilizaram o *Power Sybr-Green* (Applied Biosystems) para amplificação das amostras. Isso resultou em variações no valor de Ct

(*Threshold cycle* - números de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção), visto que, quanto mais diluída a amostra, mais tardiamente aparece a amplificação. A partir do valor de Ct de cada uma das diluições, o termociclador desenhou uma reta, formada a partir dos valores de Ct e da concentração da amostra, em cada uma das diluições. O cálculo da eficiência de cada *primer* foi feito com base na inclinação (*slope*) encontrada na reta feita pelo 7300 Real Time PCR Systems- Applied Biosystems. O valor do *slope* foi inserido na fórmula a seguir:

$$E=10^{(-1/slope)} - 1$$

Eficiência (E) de 100% resulta em uma curva padrão com *slope* de -3,32. As características dos genes analisados foram:

Genes	<i>slope</i>	Eficiência
TLR-2	-3,57	90(%)
TLR-4	-3,33	99(%)
IL-12	-3,38	97(%)
IFN-γ	-3,32	100(%)
TNF-α	-3,37	98(%)
IL-10	-3,37	98(%)
TGF-β	-3,57	90(%)
IL-17	-3,32	100(%)
Foxp3+	-3,39	97(%)
iNOS	-3,38	97(%)
β-actina	-3,37	98(%)

Todos foram considerados dentro do padrão de eficiência aceitável, com *slope* variando entre -3,30 e -3,57. Todas as reações foram finalizadas com a curva de dissociação *melting*, realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de *primer* ou de qualquer outro produto inespecífico. Até o momento nenhum gene apresentou irregularidade nesta etapa. As sequências de cada um dos *primers* estão descritas na Tabela 1.

Tabela1. Primers para citocinas, iNOS, Foxp3⁺, Beta- actina e receptores TLRs

Gene	Sequência Reverse	Sequência Forward	Gene Bank	Tamanho produto
IL-12	CTCCTGCCTCATCCTCCTGAA	CAGCCTGGGAAACATAACAAGAC	NM_002187.2	109
IFN-γ	GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA	AGCTCTGCATCGTTTTGGGTT	NM_000619.2	118
TNF-α	GATGATCTGACTGCCTGGGC	CACGCTCTTCTGCCTGCTG	NM_000594.2	105
IL-10	TCATCTCAGAACAAGGCTTGGC	CGAGATGCCTTCAGCAGAGTG	NM_000572.2	128
TGF-β	TCCAGGCTCCAAATGTAGG	GGACACCAACTATTGCTTCAG	NM_000660.4	150
TLR-2	GGTCTTGGTGTTTATTATCTTC	TCTCCCATTTCCGTCTTTTT	NM_003264.3	125
TLR-4	TCTGCTGCAACTCATTTTCAT	CCGCTTCCTGGTCTTATCAT	NM_138554.3	141
IL-17	GGATTTCGTGGGATTGTGAT	TGGGAAGACCTCATTGGTGT	NM_002190.2	84
Foxp3+	ACAGTCTCTGGAGCAGCAGC	CCACAGATGAAGCCTTGGTC	NM_014009.3	101
iNOS	GCGTTACTCCACCAACAATGGCAA	ATAGAGGATGAGCTGAGCATTCCA	NM_000625.4	109
β-actina	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	NM_001101.3	140

3.2.6.5. Quantificação relativa da expressão gênica (qPCR)

A análise da amplificação dos genes foi realizada pelo método da quantificação relativa. Para isso foi realizada a amplificação gênica, de acordo com o protocolo da *Applied Biosystems Power Sybr® Green* no ABI Prims 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems).

O volume total da reação foi de 20 μ l composto de: 1,5 μ l de cDNA, 10 μ l *Sybr Green*, 7,5 μ l H₂O RNase/DNase free e 0,5 μ l de cada *primer* (10pmol). As condições da reação foram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de anelamento, a 95°C por 15 segundos e extensão a 60° por 1 minuto, sendo os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60°C por 1 minuto). Para análise de especificidade de cada gene, foi adicionado o passo da curva de dissociação. Paralelamente, foi realizada a amplificação do gene da β -actina, visto que o valor real de expressão gênica foi realizado através da comparação do resultado da amplificação dos genes de interesses, e desse gene constitutivo. Este controle endógeno corrige variações relacionadas à quantidade de amostra utilizada na extração, à eficiência da extração do RNA e da transcrição reversa, à amplificação, à quantificação, à pipetagem e à degradação do RNA. Em todos os ensaios, as amostras foram processadas em duplicata e a concentração de cada amostra testada foi fornecida diretamente pelo programa “Sequence Detection Systems” 1.2.3 – 7300 Real Time

PCR Systems- Applied Biosystems, calculada em relação à curva padrão. Os resultados foram expressos em aumento ou diminuição da expressão gênica, fazendo uma comparação entre os diferentes momentos nos pacientes com tuberculose pulmonar e ainda entre os grupos.

3.2.7. Avaliação da expressão de TLR-2 e TLR-4 na superfície das células por citometria de fluxo

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC), obtidas conforme item 3.2.5, ajustadas na concentração 1×10^6 células/ml, foram colocadas em tubos Falcon para citômetro (BD-Becton, Dickinson and Company) e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos à 4°C. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante, em seguida, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-TLR4 conjugado com PE, com anti-TLR2 conjugado com FITC, anti-CD3 conjugado com PE-DY647 e anti-CD14 conjugado com PE-DY647 durante 20 minutos em ambiente escuro. As células foram ressuspensas em 1 ml de solução eletrolítica (ISOTON II) e fixadas com 50 μ L de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD-Becton, Dickinson and Company). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo modelo FACSCALIBUR™ (Becton Dickinson) usando o programa “Cell Quest” (Becton Dickinson) para aquisição e análise celular. A aquisição foi padronizada para 10.000 eventos por amostra. Para cada teste houve um tubo controle no qual as células foram incubadas com anticorpos controles isotípicos marcados com os respectivos fluorocromos dos testes.

3.2.8. Avaliação da produção de citocinas plasmáticas

As dosagens das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-17 e TGF- β foram realizadas pela técnica do CBA, e analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCALIBUR™ (Becton Dickinson) usando o programa “Cell Quest” (Becton Dickinson) de acordo com as indicações do fabricante.

3.2.9. Alterações genotóxicas

O protocolo usado para detecção das alterações genotóxicas em PBMC foi o descrito por Sasaki *et al.* ⁽¹¹⁵⁾ com algumas modificações. Após obtenção de PBMC, conforme descrito no item 2.5, 10 μ L da suspensão celular foi adicionado em 0.5% de agarose *low melting point*,

120 µl a 37°C, em seguida esta mistura foi adicionada em lâminas previamente recobertas com 1.5% agarose e cobertas com lamínulas. Depois da solidificação da agarose em refrigerador, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 10, 1% sodium sarcosinate com 1% Triton X-100, e 10% DMSO) por 1 h. Primeiramente as lâminas foram lavadas em PBS, colocadas em solução alcalina (pH>13) por 20 min e então submetidas a eletroforese por 20 min a 25V/cm, 300 mA. Depois da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com 0.4 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), fixadas em etanol absoluto e estocadas para análises posteriores. Independentemente, controles positivos (PBMCs) foram tratados com 100 µM H₂O₂ por 5 min, em triplicata, para garantir a sensibilidade e reprodutibilidade do ensaio. Todas as etapas foram realizadas sob condições de pouca luz. As lâminas foram coradas com SYBR Green (10mg/mL) e 100 nucleoids por lâmina foram examinados com ampliação de 400x usando um microscópio de imunofluorescência conectado a um sistema de análise de imagem (Comet Assay II, Instrumentos Perceptive, Haverhill, Suffolk, UK). Danos no DNA foram medidos através da análise de "tail intensity" (% do DNA migrados) e "tail moment" [o produto do comprimento da cauda (DNA migração) e fração de DNA na cauda do cometa, ou seja, DNA% na cauda] ⁽¹¹⁶⁾. Como os grupos mostraram diferenças estatística entre estes parâmetros, escolhemos "tail moment" para apresentar os nossos resultados.

3.2.10. Capacidade Antioxidante Total Hidrofílica (CATH) no plasma

O protocolo utilizado para a realização do CATH foi descrito por Beretta *et al.* ⁽¹¹⁷⁾. 100 ul de plasma foi diluído em 300 ul de PBS (pH 7,4) gelado. Após a diluição foram acrescentados 100ul de BODIPY (substância oxidável e fluorescente) em todas as amostras. Em seguida as amostras foram homogeneizadas por 10 segundos e incubadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos, protegido da luz. Enquanto isso foi preparado o AAPH (gerador de radicais livres). Após a incubação foram acrescentados 420 ul de PBS pH 7,4 T.A. e adicionados em todas as amostras 80 ul de AAPH agitando rapidamente. As amostras foram colocadas em triplicata em placa de 96 wells, as quais foram corridas durante 4 horas com intervalo de leitura de 5 minutos no aparelho Victor X2 – software Perkinelmer 2030 Manager. Os resultados foram expressos através do cálculo da área sobre a curva.

3.2.11. Análise Estatística

Para comparar a expressão gênica dos receptores TLRs, citocinas, Foxp3 e iNOS pela qPCR, a expressão dos receptores na superfície celular pela Citometria de fluxo, alterações genotóxicas pelo ensaio do cometa e capacidade antioxidante total hidrofílica (CATH) no tempo, foi ajustado um modelo em medidas repetidas no tempo, utilizando o proc mixed do programa SAS. Para comparar a expressão gênica dos receptores TLRs, citocinas, Foxp3 e iNOS pela qPCR, a expressão dos receptores na superfície celular pela Citometria de fluxo, alterações genotóxicas pelo ensaio do cometa e capacidade antioxidante total hidrofílica (CATH) com o grupo controle foi ajustado um modelo linear generalizado de acordo com a distribuição gamma. O ajuste foi feito utilizando o proc genmod do programa SAS for windows versão 9.2. Considerou-se $p < 0,05$ como nível de significância.



Referencias Bibliográficas

1. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5nd ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
2. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2004; 213-232.
3. Focaccia R, Veronesi R. *Tratado de Infectologia*. 3^a ed. Vol. 2. São Paulo: Atheneu, 2005.
4. Bento J, Silva AS, Rodrigues F, Duarte R. Métodos Diagnósticos Em Tuberculose. *Acta Med Port*. 2011; 24: 145-154.
5. World Health Organization Publications. <http://www.who.int/en/> WHO publications on tuberculosis. Tuberculosis facts – handout 2010. Available from: <http://www.who.int/tb/en>
6. Brasil. Ministério da Saúde. <http://www.saude.gov.br> Plano Nacional de Controle da Tuberculose/ Fundação Nacional de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
7. Glassroth J. Clinical Considerations in Designing of Vaccines for Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2000; 30: 229-232.
8. Algood HMS, Lin PL, Flynn J. Tumor Necrosis Factor and Chemokine Interactions in the Formation and Maintenance of Granulomas in Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2005; 41:189-193.
9. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Ver Saúde Pública*. 1999; 3: 281-6.
10. Jeong YJ, Lee KS. Pulmonary Tuberculosis: Up-to-Date Imaging and Management. *AJR*. 2008; 191: 834-844.
11. Small PM, Fujiwara PL. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med*. 2001; 345:189-200.
12. Ager EM, Andersen P. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine*. 2002; 21: 7-114.

13. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice: latent tuberculosis infection. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1860-1866.
14. Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect*. 2003; 5: 159-67.
15. Kaufmann SHE. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum*. 2002; 61: 1154-58.
16. Iseman MD, Madsen LA. Drug resistant tuberculosis. *Clin Chest Med*. 1989; 338: 1641-9.
17. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003; 102: 2660-69.
18. Parker LC, Whyte MKB, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *Journal of leucocyte. Biology*. 2005; 77: 886-92.
19. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 499-511.
20. Medzhitov R. Review. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature*. 2001; 1: 135-145.
21. Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate Immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Op. Immunol*. 2001; 2: 675-680.
22. Eun-Kyeong J, Jeong-Kyu P, Hazel MD. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; 16: 205-10.
23. Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JWM, Kulberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate immune system. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75: 749-55.
24. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and type I interferons. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 15319-23.

25. Ryan KA, Smith MF, Sanders MK, Ernst PB. Reactive Oxygen and nitrogen species differentially regulate toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kB and Interleukin-8 expression. *Infection and Immunity* 2004; 72: 2123-30.
26. Doherty TM, Arditi M. TB, or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? *J Clin Invest.* 2004; 114: 1699-703.
27. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, et al. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 1036-44.
28. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science.* 1999; 285: 732-5.
29. Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. The DC14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol.* 1999; 163: 6748-55.
30. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999; 163: 3920-7.
31. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle JT, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor 2- dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2001; 167: 910-8.
32. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* 1999; 274: 33419-25.
33. Underhill Dm, Ozinsky A, Smith KD, Adreem A. Tol-like receptor-2 mediates mycobacterial induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 14459-63.

34. Krutzik SR, Ochoa MT, Takeuchi O, Ochoa MT, et al. Induction of direct antimicrobial activity. *Nat Med.* 2003; 9: 525-31.
35. Edwards D, Kirkpatrick C. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134: 1062-71.
36. Ladel CH, Szalay G, Reidel D, Kaufmann SHE.. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Infect. Immun.* 1997; 65: 1936–38.
37. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 1997; 159: 635–43.
38. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature.* 1999; 400: 269–71.
39. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 1995; 155: 2515–24.
40. Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology.* 1995; 84: 423–32.
41. Lyadova I, Yermeev V, Majorov K, Nikonenko B, Khaidukov S, Kondratieva T, Kobets N, Apt A. An ex vivo study of T lymphocytes recovered from the lungs of I/St mice infected with and susceptible to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1998; 66: 4981–88.
42. Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by *Mycobacterium* reactive human T-cell clones. *Infect. Immun.* 1993; 61:197–203.
43. Denis M, Gregg EO, Ghandirian E. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* 1990; 12: 721-7.

44. Eun-Kyeong J, Jeong-Kyu P, Hazel MD. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16: 205-10.
45. Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* 1999; 103:1023–29.
46. Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM, Kornfeld H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1997; 65:5149–56.
47. Gerosa F, Nisii C, Righetti S, Micciolo R, Marchesini M, Angelo Cazzadori,§ and Giorgio Trinchieri. CD41 T Cell Clones Producing both Interferon-g and Interleukin-10 Predominate in Bronchoalveolar Lavages of Active Pulmonary Tuberculosis Patients *Clinical Immunology* Vol. 92, No. 3, September, pp. 224–234, 1999
48. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent TH2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 1996; 64: 1351–56.
49. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1995; 63: 3231–34.
50. Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J. Immunol.* 1999; 163: 3898–3906.
51. Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8C T cells primed for production of Type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect. Immun.* 1999; 67: 3980–88.
52. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 679-91.

53. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, MakTW, Bloom BR. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *M. tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995; 2: 561–72.
54. Bean AGD, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, Britton WJ. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF genotargeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol*. 1999; 162: 3504–11.
55. Moreira AL, Tsenova-Berkova L, Wang J, Laochumroonvorapong P, Freeman S, Freedman GK. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tubercle Lung Disease*. 1997; 78: 47–55.
56. Flesch I, Kaufmann SHE. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect. Immun*. 1990; 58: 2675–77.
57. Chan J, Xing Y, Magliozzo R, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med*. 1992; 175: 1111–22.
58. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol*. 1990; 145: 4306–10.
59. Bhatt K, Salgame P. Host Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Immunology*. 2007; 27: 347-362.
60. Collins HL, Kaufmann SHE. The many faces of host response to tuberculosis. *Immunology*. 2001; 103: 1-9.
61. Van Crevel R, Ottenhoff TH, Van Der Meer JW. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 294-309.
62. Flynn JI, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Ann Rev Immunol*. 2001; 19: 93-129.

63. Sadek MI, Sada E, Toossi Z, Schwander KS, Rich EA. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 1998; 19: 513-21.
64. Damjanovi LJ. Anderson's pathology. Part two: systemic pathology. 10th ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1996; 582-4.
65. Mc Gee JOD, Issacson PG, Wright NA. Oxford Textbook of Pathology: principles of pathology. Oxford: Oxford University Press; 1992. p. 481-3.
66. Stevens A, Lowe J. Pathology. 10th ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1995. Tissue Response to Damage 5:75-81, Immune, infective Environmental and nutritional factors in Disease. 1995; 7: 100-2.
67. Mustafa AS, Oftung F. Cytokine production and cytotoxicity mediated by CD4+ T cells from health subjects vaccinated with *Mycobacterium bovis*, BCG, and from pulmonary tuberculosis patients. *Nutrition*. 1995; 11: 698-701.
68. Robbins SL, Cotrn SR, Kumar V. Fundamentos da patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 84-5.
69. Orme IM. The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. *Trends Microbiol*. 1998; 6: 94-7.
70. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010; 21: 455-462.
71. Bettelli E, Korn T, Kuchroo V. Th17: the third member of effector T cell trilogy. *Current Opinion in Immunology*. 2007; 19: 652-657.
72. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995; 3: 811-21.

73. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 2009; 31: 799–810.
74. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004; 21: 467- 476.
75. Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008; 41: 70-83.
76. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain RM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell response after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol*. 2007; 8: 369-77.
77. Cooper AM, Solache A, Khader SA. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Curr Opin Immunol*. 2006; 19: 441-47.
78. Jang S, Uzelac A, Salgame P. Distinct chemokine and cytokine gene expression pattern of murine dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008, 84.
79. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun*. 2001; 69: 4195-201.
80. Zahrt TC, Deretic V. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 294-309.
81. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavolon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation between the Kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1996; 89: 26-33.

82. Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Mariana V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1997; 90: 607-17.
83. Lasco TM, Cassone L, Kamohara H, Yoshimura T, McMurray DN. Evaluating the role of tumour necrosis factor-alpha in experimental pulmonary tuberculosis in the guinea pig. *Tuberculosis*. 2005; 85: 254-8.
84. Juffermans NP, Verbon A, Van Deventer SJH, Buurman WA, Van Deutekom H, Speelman P, et al. Tumour necrosis factor and interleukin-1 inhibitors as markers of disease activity of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: 1328-31.
85. Oberg HH, Juricke M, Kabelitz D, Wesch D. Regulation of T cell activation by TLR ligands. *European Journal of Cell Biology*. 2011; 90: 582–592.
86. Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clinical Immunology*. 2007; 123: 50–59.
87. He XY, Xiao L, Chen HB, Hao J, Li J, Wang YJ, He K, Gao Y, Shi BY. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 6: 643-650.
88. Peresi E, Silva SMUR, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2008; 34: 942-949.
89. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11: 165-90.
90. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 329: 2002-12.

91. Balcewicz-Sablinska MK, Keaane J, Kornfelk H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of host TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *J Immunol.* 1998; 161: 2636-41.
92. Bingisser P, Stey C, Weller M, Groscurth P, Russi E. Apoptosis in human alveolar macrophages is induced by endotoxin and is modulated by cytokines. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1996; 15: 64-70.
93. Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, Lu S, Wang E, Yamamura M, et al. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. *J Immunol.* 1992; 149: 541-7.
94. Kasahara K, Kobayashi K, Shikama Y, Yoneya I, Soezima K, Ide H. Direct evidence for granulom-inducing activity of interleukin-1. *Am J Pathol.* 1988; 130: 629-38.
95. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vasalli P. The inducing role of tumour necrosis factor in development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell.* 1989; 56: 731-40.
96. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner J.J. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculosis granulomatous lung lesions. *J. Immunol.* 1995;154: 465.
97. Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton B, Ellner JJ, Toossi Z. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1996; 64: 399-405.
98. Numerof RP, Aronson FR, Mier JW. IL-12 stimulates the production of IL-1 α and IL-1 β by human peripheral blood mononuclear cells. *J Immun.* 1988; 141: 4250-7.
99. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of human Cd41 ab T-cell-receptorpositive (TCR1) and gd (TCR1 T-Cell- Responses to *Mycobacterium tuberculosis* by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-Beta. *Infect Immun.* 1999; 67: 6461-72.

100. Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta. *J Infect Dis.* 1994; 170: 1229-37.
101. Rao VV, Gupta EV, Thomas JM. Chromosome damage in untreated tuberculosis patients. *Tubercle.* 1990; 71: 169-172.
102. Porta C, Riboldi E, Sica A. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer, *Cancer Lett.* 2010. in press
103. D' Souza D, Das BC. Genotoxic effects of *mycobacterium leprae* infection in humans. *Mutat. Res.* 1999; 305: 211-222.
104. Gandhi G, Singh B. DNA damage studies in untreated and treated leprosy patients. *Mutagenesis* 2004; 19: 483-488.
105. Oka K, Chan L. Inhibition and regression of atherosclerotic lesions. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52: 311–319.
106. Nalbandian A, Yan BS, Pichugin A, Bronson RT, Kramnik I. Lung carcinogenesis induced by chronic tuberculosis infection: the experimental model and genetic control. *Oncogene.* 2009; 28: 1928–1938.
107. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4: 281–286.
108. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 39–47.
109. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85: 103–111.
110. Selek S, Aslan M, Horoz M, Celik H, Cosar N, Gunak F, Kocyigit A. Peripheral DNA Damage in Active Pulmonary Tuberculosis. *Environmental Toxicology.*

111. Oliveira LRC, Cezario GAG, Lima CRG, Nicolete VC, Peresi E, Sibio MT, Picka MCM, Calvi SA. DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*. *Mutation Research*. 2011; 723:177– 181.
112. Ribeiro DA, Calvi SA, Picka MCM, Peresi E, De Carvalho TB, Caetano PK, Nagoshi LR, Lima CRG, Marcondes- Machado J, Salvadori DM. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*, *Exp. Parasitol*. 2006; 116:296-301.
113. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem*. 2004; 266: 37-56.
114. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968; 97:7.
115. Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Oshita M, Kabasawa K, Iwama I, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res*. 2002; 519: 103-119.
116. A. Hartmann, E. Agurell, S. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis* 2003; 18: 45– 51.
117. Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russel RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem*. 2006; 354: 290-298.



4. Artigos

4.1. Artigo 1: Submetido para a revista *Tuberculosis*

Effect of treatment on TLR2 and 4 receptor expression and cytokine profile in pulmonary tuberculosis

Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira ^{a*}, Eliana Peresi ^a, Marjorie de Assis Golim ^b, Mariana Gatto ^a, Sueli Aparecida Calvi ^a

^aTropical Diseases Department, Botucatu School of Medicine – UNESP, São Paulo State University, Brazil

^bFlow Cytometry Laboratory, Hemocenter, Botucatu School of Medicine – UNESP, São Paulo State University, Brazil

*Corresponding author: Tropical Diseases Department, Botucatu Medical School-UNESP, Distrito de Rubião Junior, CEP: 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil. Tel: +55 (14) 3811-6372 or +55 (14) 3811-6212

Email: larissaragozo@yahoo.com.br (L.R.C. Oliveira)

Emailaddresses: elianaperesi@yahoo.com.br (E. Peresi), marjorie_unesp@yahoo.com.br (M.A. Golim), marianagatto11@hotmail.com (M. Gatto), sacalvi@yahoo.com.br (S.A. Calvi)

Abstract

Toll-like Receptors (TLRs) play an important role in mycobacterial infection, however little is known about the effect of treatment in this process. Our objective was to evaluate the effect of anti-tuberculosis treatment on RNA expression and on surface cell of TLR2 and TLR4, iNOS expression, and cytokine profile Th1, Th2, and Th17 in pulmonary tuberculosis patients. Total blood samples were studied from PPD⁺ healthy controls and from patients during tuberculosis treatment. After obtaining mononuclear cells from peripheral blood, gene quantification was by qPCR and cell surface expression by flow cytometry. Cytokine quantification was by the CBA technique. Treated patients presented higher gene expression and higher numbers of receptors on the cell surface of lymphocytes and monocytes than control individuals. Cytokines IL-12 and IFN- γ increased after the start of treatment while TNF- α reduced. TGF- β presented the highest levels during treatment. IL-10 and IL-17 expression and production tended to increase during treatment. Gene iNOS expression was reduced throughout all treatment in patients. Our results suggest that anti-tuberculosis treatment modulates immune response, inducing an increase in TLR receptors and pro and anti-inflammatory cytokines to combat bacteria and reduce the inflammatory process.

Keywords: Tuberculosis, TLR receptors, Cytokines, Anti-tuberculosis treatment

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease with chronic evolution; its a etiological agent is intracellular bacteria *Mycobacterium tuberculosis*.¹ The World Health Organization (WHO)² estimates that one third of the world population are infected by the bacillus, with 9.4 million new cases and 1.7 million deaths from the disease every year. Tuberculosis is lethal without treatment which is fundamentally chemotherapy, drastically reducing mortality, reducing the transmissible period, and when used prophylactically, prevents sickening, and is thus a very import tool in disease control¹. There are currently four first-line antimicrobials, isoniazid, ethambutol, pyrazinamide, and rifampicin, which are reasonably effective in treating individuals with active tuberculosis, but they are inefficient during the latent stage of the disease.^{3,4} In general, anti-tuberculosis drugs act by enzymatic interference or by blocking protein synthesis.

The initial defence mechanism against *M. tuberculosis* involves phagocytosis of the microorganism by alveolar phagocytes. After this process, IL-12 is produced by macrophages and dendritic cells which stimulate Natural Killer cells (NK) to produce IFN- γ . IL-12 stimulates a Th1 response to produce more IFN- γ .^{5,6} IFN- γ is responsible for activating macrophages to produce TNF- α , which in synergy with IFN- γ , acts increasing the phagocytosis process and its microbicide activity, through the production of the reactive nitrogen and oxygen intermediaries involved in growth inhibition and death of mycobacteria.⁷⁻¹⁰ Also, TNF- α is essential for forming and maintaining granuloma.^{11,12,7} Studies have suggested that protector immunity to *M. tuberculosis*, as well as Th1 cells, requires Th17 mainly at the start of infection.¹³ The differentiation of this profile is initiated by naïve T cell activation in the presence of IL-6, IL-21, and low quantities of TGF- β , inducing the expression of nuclear receptor ROR γ t.^{14,15} These cells have important pro-inflammatory functions and are defined by the production of IL-17A to IL-17F cytokines.^{16,17} IL-17 has pro-inflammatory properties inducing expression of cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF, and G-CSF), chemokines (CXCL1, CXCL10), and metalloproteinases, important in neutrophil recruitment, activation, and migration.¹⁸ However, despite the protector effect of Th1 and Th17 response against tuberculosis, the elevated expression of pro-inflammatory cytokines is related with its immunopathogenesis.^{19,20} To limit this deleterious action, anti-inflammatory mechanisms appear, represented by soluble TNF- α receptors which impede this

cytokine binding to its receptor, through signal blockade by regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-10, and TGF- β .²⁰⁻²²

Initial microorganism recognition is mediated by pattern recognition receptors (PRRs), germ line-encoded receptors that conserve microbial structures referred to as pathogen-associated molecular patterns.²³ Toll-like receptors (TLRs) are essential PRRs that mediate the recognition of microbial structures and induce inflammatory and adaptive responses.²⁴ Recognition of *M. tuberculosis* by TLRs on the cell surface is an important determinant of host immune response efficacy. Mycobacterial products can be mainly recognised by TLRs2/4, and their DNA by TLR-9.²⁵ TLR-2 is the main receptor for the mycobacterial constituents, recognising lipoarabinomannan (LAM), its precursor “phosphatidylinositol mannoside” (PIM), and 19-kDa lipoprotein.²⁶⁻³⁰ This receptor is involved in response to full mycobacteria and may also influence in your the processing after phagocytosis by macrophages.³¹ Also, this mycobacterium can induce TLR-2 expression by recruiting this receptor for the phagocytic envelope inside macrophages, presenting this receptor as a primary sensor to recognise invader microorganisms.^{32,33} TLR-4 is not a receptor just for exogenous ligands, such as LPS from gram-negative bacteria, it can recognise endogenous ligands like heat shock protein HSP 60/65, a protein excreted by mycobacteria.^{34,35} Studies have shown that recognition of mycobacterial products by TLRs leads to NF- κ B activation and consequently to gene transcription producing pro-inflammatory cytokines such as IL-12, TNF- α , IL-1 β , and nitric oxide.³⁶ Also some studies have shown that heat shock protein HSP60 can modulate immune response in a microenvironment favouring a Th2 environment through increased TLR2 and reduced TLR4 expression on the surface.³⁷

Studies have shown that TLRs are decisively involved in infection pathogenesis for *M. tuberculosis*, in that expression of these receptors in some way regulates the intracellular destination of bacteria through a complicated cascade of regulator and deregulator factors. In light of these observations and due to the absence of information in respect of anti-tuberculosis treatment in these processes, studies evaluating TLR receptors and Th1, Th2, and Th17 cytokines in patients during anti-tuberculosis treatment, may contribute to a better understanding of the host/parasite relationship in this disease. This study evaluated the effect of treatment on RNAm expression from TLR2, TLR4 and iNOS, the expression and production of IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10, and TGF- β in pulmonary tuberculosis patients.

2. Materials & Methods

2.1. Patients

The study recruited pulmonary tuberculosis patients attending the Infectious and Parasitic Diseases Services at Botucatu Medical School University Hospital – UNESP, Botucatu Teaching Health Centre, and Primary Healthcare units of Botucatu and the surrounding region, and healthy individuals working in health areas at Botucatu Medical School University Hospital. The tuberculosis patients were diagnosed using information about contact with TB, medical history, and clinical symptoms (cough, haemoptysis, thoracic pain, fever, and weight loss), presence of alcohol-acid resistant bacilli by bacilloscopy, and those who had symptoms characteristic of pulmonary TB in thoracic x-rays. Exclusion criteria were patients with extra-pulmonary TB, HIV-positive individuals or those with other immunodeficiencies, patients with other granulomatous, autoimmune diseases, or cancer, and pregnant women. Controls were healthy adults without clinical pulmonary tuberculosis, health area professionals from Botucatu Medical School University Hospital, and with PPD⁺. The PPD test consists of an intradermic injection of 0.1ml (2U) of derived purified protein. Hardening ≥ 5 mm, measured 72h later was considered positive. In total, 20 controls (G1) and 19 pulmonary TB patients (G2) (13 males and 6 females, mean aged 49 and 37 years, respectively) were studied. In this group measurements were taken at three times: **M1**-patients with up to one month of anti-tuberculosis treatment; **M2**-in the third month of treatment; **M3**-at the end of six months treatment. Signed free informed consent forms were obtained from all individuals. The study was approved by Botucatu Medical School – UNESP Research Ethics Committee. Patients were treated for six months using the standard RIPE (isoniazid, ethambutol, pyrazinamide, and rifampicin) scheme.

2.2. Blood sample collection

Blood samples (20ml) were collected from the forearm vein at one moment in the controls and three different moments in the pulmonary TB patients. Samples were collected in heparinized tubes and initially centrifuged at 1500 g for 10 minutes to obtain plasma for measuring cytokines by CBA. Remaining blood samples were used to obtain peripheral blood mononuclear cells for later evaluation of gene expression of TLR2, TLR4, iNOS and cytokines and expression of TLR2, TLR4 in the cell surface by flow cytometric.

2.3. Harvesting mononuclear cells from peripheral blood

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Histopaque^R gradient separation⁽³⁸⁾. The lymphocyte and monocyte rich ring was washed with PBS for 15 minutes at 1500 rpm. The cell suspension was then re-suspended in PBS. Cell identification and viability was performed by Turk count. Then 1×10^6 /ml or 2×10^6 /ml cell concentrations were obtained for the prescribed protocols.

2.4 RNAm expression for TLR2 and 4 receptors, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 and TGF- β cytokines, and iNOS

Total RNA was extracted from 2×10^6 cells/ml of PBMC obtained at M1 to M3 by the TRIZOL method (GibcoBRL, São Paulo, Brazil). RNA concentration was determined by absorbance at 260nm; all samples showed an absorbance value of approximately 2.0. One microgram of RNA was used for the synthesis of 20 μ L of complementary DNA (cDNA) by SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, São Paulo, Brazil). TLR2, TLR4, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β , and IL-17 mRNA levels were determined by real-time PCR. Primer sequences are shown in Table 1. The β -actin gene was used as internal control. Quantitative measurement was performed using the SYBR Green qPCR kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions on an ABI Prims 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems). The real-time PCR cyclers conditions were as follows: 95°C for 10 minutes, followed by 40 annealing cycles at 95°C for 15 seconds and extension at 60°C for 1 minute, with fluorescence signals taken during the annealing and extension cycle of amplification (60°C for 1 minute). Product purity was confirmed by dissociation curve analysis. Gene expression was quantified relative to control group values after adjusting for β -Actin. Samples from each moment (M1-M3), from each group (G1 and G2) were analysed in duplicate. Results were presented as increase or decrease in gene expression.

2.5. TLR-2 and TLR-4 expression on the cell surface

PBMC obtained as per item 2.3 adjusted to a concentration of 1×10^6 cells/ml were centrifuged at 1800 rpm for 10 minutes at 4°C. Supernatant was then discarded and cells incubated with monoclonal anti-TLR4 antibody conjugated with PE, anti-TLR2 antibody conjugated with FITC, anti-CD3 antibody conjugated with PE-DY647, and anti-CD14

antibody conjugated with PE-DY647 (Biolegend, Brazil) for 20 minutes in a dark environment. After incubation, cells were re-suspended in electrolyte solution (ISOTON II) and fixed with a fixer solution containing 5% formaldehyde (BD-Becton, Dickinson and Company). Analyses were made in a flow cytometer (FACSCALIBUR™ Becton Dickinson) using Cell Quest software (Becton Dickinson) for cell acquisition and analysis. Acquisition was standardized for 10,000 events per sample. Each test had a control tube in which cells were incubated with isotopic control antibodies marked with the respective fluorochromes.

2.6. Plasmatic cytokine production

Cytokine levels for IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-17, TGF- β and IL-10 were measured by the CBA technique and analysed by flow cytometer (FACS CALIBUR™ Becton Dickinson) using Cell Quest software (Becton Dickinson) according to manufacturer's instructions.

2.7. Statistical Analysis

Gene expression of TLR2, TLR4, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β was compared by qPCR and plasma cytokines quantified by CBA with time, using an adjusted model of repeated measurements in time and the Mixed procedure in SAS statistics software. A generalized linear model adjusted to gamma distribution was used to compare TLR2, TLR4, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β , and IL-17 gene expression by qPCR and quantify plasma cytokines by CBA with controls. The adjustment was made using the Genmod procedure in SAS for Windows V9.2. Significance level was considered as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of treatment on TLR2 and TLR4 receptors gene expression

To verify whether anti-tuberculosis treatment altered TLR2 and 4 expression, mRNA expression for both receptors was evaluated in the control group (G1) and patient group (G2) during anti-tuberculosis treatment (M1-M3). No statistical differences were detected in TLR2 gene expression between patients at different treatment moments (M1, M2, and M3). TLR2 gene expression in patients during treatment (M1- $p=0.003$; M2- $p=0.003$; and M3- $p=0.0002$) was significantly higher than in control individuals. Gene expression by this

receptor tended to increase during treatment (Figure 1A). TLR4 gene expression was significantly higher in pulmonary tuberculosis patients (G2) during treatment ($p=0.01$; $p=0.01$; $p=0.04$) than in controls (G1) (Figure 1B). No statistical differences were detected in TLR4 gene expression between patients at different treatment moments (M1, M2, and M3). Gene expression by this receptor tended to be diminished during treatment (Figure 1B).

3.2. Surface expression of TLR2 and TLR4 on lymphocytes and monocytes during anti-tuberculosis treatment

To determine the effect of treatment on the expression and co-expression of TLR2 and 4 receptors on monocyte and lymphocyte cell surfaces was evaluated by measuring the percentage of CD3⁺ and CD14⁺ cells positive for TLR2 and 4 during treatment. Surface expression of TLR2 on lymphocytes (Figure 1C) in patients was significantly lower at M1 than M2 ($p=0.006$) and M3 ($p=0.04$). G2 presented a significant increase in expression of this receptor at M2 ($p<0.0001$) and M3 ($p<0.0001$) than in G1. At all three treatment moments in G2, expression of TLR4 (M1- $p=0.0019$; M2- $p<0.0001$; M3- $p<0.0001$) and co-expression of TLR2/4 (M1- $p=0.0006$; M2- $p<0.0001$; M3- $p<0.0001$) on lymphocyte cell surfaces was significantly higher than G1, and tended to increase during treatment. TLR4 expression was also significantly higher at M3 than at M1 ($p=0.001$) and M2 ($p<0.0001$). Co-expression of TLR2/4 at M3 was significantly higher than at M1 ($p=0.02$) (Figure 1C).

Monocyte analysis (Figure 1D) showed increased TLR2 expression in G2 at M1 (not significant), M2 ($p=0.004$), and M3 ($p<0.0001$) compared to G1. It was also significantly higher in M3 than M1 ($p=0.004$). Co-expression results for these receptors on monocyte cell surfaces also showed a significant increase in its expression in G2 at the start of treatment (M1; $p=0.005$), in the third month of treatment (M2; $p<0.0001$) and at the end of treatment (M3; $p=0.01$) compared to G1. Expression of TLR4 in G2 at M1 ($p=0.0019$) was significantly higher compared to G1. Interestingly, cell marking with anti-CD3⁺ and anti-CD14⁺ showed that TLR2 expression was much higher than TLR4 in both monocytes and lymphocytes, and that the majority of cells expressing TLR4 also expressed TLR2.

3.3. Effect of treatment on RNA expression and cytokine production

To determine the effect of treatment on Th1, Th2 and Th17 response, we evaluated RNA expression and IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10, and TGF- β production during

treatment. In G2 RNA expression and IL-12 production tended to increase during treatment. Significantly higher levels of RNA expression were detected at M2 and M3 ($p=0.005$ and $p=0.001$) in relation to controls. Increased IL-12 production levels were in G2 at M2 and M3 ($p<0.0001$ and $p=0.0009$) in relation to controls (Figure 2A and B). In relation to gene expression and IFN- γ production, treatment induced significantly elevated levels of this cytokine at M2 ($p=0.02$) and M3 ($p=0.001$), and gene expression presented higher levels at M1 ($p=0.0003$), M2 ($p<0,0001$) and M3 ($p=0,001$) compared to control individuals. No significant differences were detected in RNA expression for IFN- γ during treatment; and production was significantly higher at M2 in relation at M1 ($p=0.02$); both gene expression and IFN- γ production tended to decrease at M3 (Figure 2C and D).

Analysis of gene expression and TNF- α production (Figure 2E and F) showed a significant increase in expression at M1 ($p=0.03$) and M2 ($p=0.009$), and in production at M1 ($p=0.005$) in pulmonary tuberculosis patients (G2) compared to controls (G1). No statistical differences were detected in TNF- α expression between different treatment times. TNF- α production was lower in M3 ($p=0.01$) than in M1. Gene expression and IL-17 production in patients (G2) did not present any statistical differences in relation to the control group. There were also no differences between the different treatment times (M1, M2 and M3) (Figure 2G and H).

Gene expression of IL-10 in patients was significantly higher at M1 ($p=0.01$) and M3 ($p=0.01$) compared to controls; IL-10 production in patients (G2) did not present any statistical differences in relation to the control group. There were also no differences between the different treatment times (M1, M2 and M3) (Figure 3A and B). Gene expression of TGF- β in the patients group (G2) was significantly higher at M2 ($p=0.006$) in relation to controls (G1). TGF- β production showed a significant increase in expression at M1 ($p<0,0001$), M2 ($p=0,001$) and M3 ($p=0,01$) in relation to G1 (Figure 3C and D).

3.4. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) expression during anti-tuberculosis treatment

Induction of iNOS gene expression in the pulmonary tuberculosis group (G2) was significantly lower at M1 ($p=0.01$) and M2 ($p=0.03$) than in controls (G1) (Figure 4). Also expression of this enzyme was higher at M3 ($p=0.001$) than M1.

4. Discussion

In this study we evaluated the effect of anti-tuberculosis treatment on gene expression and cell surface receptors TLR-2 and TLR-4 in pulmonary tuberculosis patients. We detected that patients express both receptors and expression increases with anti-tuberculosis treatment. We also found that when the cells were marked with anti-CD3⁺ and anti-CD14⁺, both lymphocyte and monocyte populations presented higher TLR2 expression than TLR4, and that most cells which expressed TLR4 also expressed TLR2. These results are in agreement with other studies demonstrating that TLR2 and 4 receptors are involved in *M. Tuberculosis* recognition.^{25,39,40}

Our results also show that although receptor expression is higher in monocytes, we also observed it in lymphocytes. These results are in agreement with other studies which have shown increases in mRNA expression from TLR receptors in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in acute tonsillitis⁴¹, and increased TLR2 and TLR4 expression in TB patient pleural fluid in various lymphocyte subtypes.⁴² TLRs play an essential role in innate immune response and in initiating adaptive immune responses, however, certain TLR are also expressed in T lymphocytes, including CD4⁺ T, CD8⁺ T, and Foxp3⁺ T regulator cells, and their respective ligands can directly modulate the function of these cells. These receptors in T lymphocytes can act as co-stimulation receptors for TCR receptor, increasing the proliferation and/or production of stimulated T cell cytokines. Different antigens from mycobacteria can indirectly modulate T cell function through functional changes in antigen presenting cells, however, direct interactions between *M. tuberculosis* molecules and T cells can occur when mycobacterial components contained in vesicles are liberated by infected macrophages.⁴³⁻⁴⁵ This suggests that TLR ligands can become accessible to the extracellular environment and interact with uninfected cells, for example T cells.⁴³⁻⁴⁵ In this way, the bonding of mycobacterial lipoproteins to TLR2 directly induces NF-κB activation in resident CD4⁺ T cells, in the absence of TCR, developing a pre-activation.⁴⁶ However, a complete and productive activation of T cells depends on simultaneous stimulation of the TCR receptor.⁴⁷ Also, TLR ligands have different effects on innate immune system cells, such as monocytes; these effects include the induction and production of cytokines, expression of co-stimulatory molecules, and expression of MHC II molecules. Studies in mice with genes from inactivated TLR show that TLR2 expression in monocytes is important in infection control and survival in these animals. On the other hand, other studies have suggested the protector role of TLR4 expression in monocytes in mouse survival⁴⁸⁻⁵¹, depending on *Mycobacterium* dose.⁵¹

In this study mRNA expression in patients was elevated in both TLR2 and TLR4, but flow cytometry analysis showed a much higher TLR2 expression on the cell surface. These results could have occurred because the stable state of mRNA levels is represented by the balance between messenger stability and gene transcription ratio. Messenger RNA for many molecules involved in inflammation in response to stress, is normally unstable probably to permit fast regulation in response to environmental changes.⁵² Studies have reported that TLR4 expression is destabilized after challenge with LPS in murine models, and both transcription activity and RNA stability contribute to TLR4 expression levels. Studies have suggested that the mRNA levels for TLRs are sensitive to increases in inflammatory cytokine levels or to circulating mycobacteria components.⁵³

The important role of IL-12 in protection against *M. tuberculosis* has been observed.⁵⁴ We detected that patients with pulmonary tuberculosis presented similar plasmatic levels and gene expression of this cytokine to controls when at the start of treatment, which rose during anti-tuberculosis treatment. Some studies have shown that mononuclear cells from peripheral human blood, when stimulated with 19kDa and 38kDa antigens from mycobacteria, produced elevated levels of this cytokine.⁵⁵ Contrary to what we observed in our study, others have shown that serum levels of IL-12p40 were not higher in patients with active tuberculosis than in healthy controls or with contactants during anti-tuberculosis treatment.⁵⁶ A possible explanation for these differences could be differences in experimental protocols, such as treatment periods evaluated and cytokine detection techniques. On the other hand, and in agreement with our results, other reports have shown that after 2 months of treatment, IL-12 levels considerably increased, becoming higher than controls.⁵⁷ Our results show that IL-12 levels in patients at the start of treatment were similar to control individuals, suggesting that in this phase, these levels were probably still insufficient to induce a protector response, a process which was seen during treatment. In individuals where the disease was more severe, IL-12 levels were higher than in those where the disease was more moderate⁵⁸, results which agree with ours, as probably our patients presented a more moderate form of the disease, as in the absence or start of treatment, levels of this cytokine were similar to those in control individuals.

IFN- γ has a fundamental role in the development of protector response in tuberculosis.⁵⁹ It has been shown that genes defective production in IFN- γ or its receptor are inclined to serious mycobacterial infections, including *M. tuberculosis*.⁶⁰ However, in patients our study presented significantly increased mRNA expression for IFN- γ at the beginning of treatment, while plasma levels tended to increase during treatment in relation to control

individuals. Also, protein expression but mainly production increased in the three months of treatment, and tended to decrease at the end of treatment. Recently diagnosed patients presented higher serum IFN- γ levels than individuals with previous tuberculosis history, and these individuals presented similar levels of this cytokine to healthy controls. However, when evaluating treatment, untreated individuals presented much higher levels of this cytokine which gradually reduced during treatment.⁶¹ These results differ from ours and other studies where IFN- γ is shown to increase during the course of treatment.⁵⁷ The probable explanation for this cytokine increasing after treatment is based on some studies which have shown that at the moment of tuberculosis diagnosis, IFN- γ concentration is much higher at the infection site than in peripheral blood, suggesting that during tuberculosis activity, there is a compartmentalisation of specific lymphocytes against the mycobacterial antigen at the infection site, and that the increase in IFN- γ serum concentrations, in the chemotherapy stage, coincides with the arrival of the lymphocytes in peripheral blood.⁶² In contrast to our findings, other studies have observed that IFN- γ levels were depressed in patients with active tuberculosis.^{63,64} Patients with the moderate form of TB presented higher IFN- γ levels than those with the more severe form.⁵⁷ Therefore, through these studies we can suggest taking into account that IFN- γ levels in untreated patients were similar to those in control individuals, and that treatment significantly increased these levels, our patients presented a more moderate form of the disease, as most of them were recruited from out-patient clinics and not from hospital wards. Although our results showed that expression of this cytokine was higher at the start of treatment, this did not translate into production which only showed a trend towards being higher than control individuals. Levels in this phase of treatment were not related to protection, probably because quantities were still not adequate to activate the mechanism responsible for mycobacteria destruction. IFN- γ increased during treatment and was probably sufficient to activate protector response.

TNF- α , an important cytokine for infection control, is involved in the macrophage activation process, but it is also an important factor related to disease immunopathology.⁶⁵ Tuberculosis patients in our study presented significantly higher TNF- α levels than controls. During treatment, patients presented gradually reducing levels of this cytokine. Other studies have also shown that individuals with tuberculosis presented elevated TNF- α levels in mononuclear cell culture supernatant from peripheral blood compared to controls, which reduced during treatment.^{65,61} However, our study shows that despite the high TNF- α levels in patients at the start of treatment, we would suggest that in this phase it was not protector, and

was probably involved with disease pathogenesis, and with treatment these levels became much lower and could be related to protection, involved in the parasite destruction mechanisms. TNF- α , depending on concentration produced, could be involved in immunopathological effects such as fever, body weight reduction, tissue necrosis, and shock.⁶⁶⁻⁷³ In this sense, low body weight in African tuberculosis patients was associated with increased levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β .⁷⁴

In our study, pulmonary tuberculosis patients tended to present much lower IL-17 levels at the start of treatment compared to controls. During treatment, production and expression tended to increase. Th17 cells which are involved in the development of inflammatory and autoimmune diseases are also involved in protection against some intracellular pathogens⁷⁵⁻⁷⁷ including *M. tuberculosis*.^{78,79} However, the exact role of Th17 cells in individuals with pulmonary tuberculosis is not very clear.⁸⁰ IL-17 can be induced immediately after pulmonary infection with BCG⁷⁸, and can also be detected in the later stages (4-52 weeks) of *M. tuberculosis* infection.⁷⁹ The frequency of Th17 cells in pulmonary TB patients has been reported as significantly lower than in healthy controls and individuals with latent TB.⁷⁵ These results suggest that reduced Th17 response could be associated with the clinical of the infection, and that this cell subtype might be more involved with protection than disease immunopathogenesis, which probably agrees with our findings, as untreated and patients at the start of treatment had low IL-17 which tended to increase with treatment and parasite destruction.

Some studies have shown that patients with a recent diagnosis of pulmonary tuberculosis present higher serum levels of IL-10 than previously treated or healthy individuals; however treatment reduces serum concentrations of this cytokine.^{56,61} Results which disagree with ours as levels of IL-10 tended to increase during treatment. We observe differences in relation to production and expression during treatment. Differences between expression and production can be explained by mRNA stability and transcription rate and factors of translational regulatory which can directly affect the expression and production of mediators involved in immune response.⁵³ However, other studies have observed that before treatment, tuberculosis patients presented similar levels of this cytokine to controls.⁸¹ In our study, despite elevated expression, IL-10 production was low in patients at the start of treatment, suggesting that its main actuation was at the end of treatment, exerting a regulatory role to control the inflammatory process.

In tuberculosis, TGF- β can primarily exert a suppressor role for Th1 profile, and participate in fibrosis induction.⁶⁵ In low concentrations, it still acts as a chemotactic factor

for monocytes, inducing IL-1 α and TNF- α secretion, as well as participating in Th17 cell differentiation together with IL-6 and IL-21¹⁴, and in Treg cells.⁸² In our study, gene expression of TGF- β mainly tended to increase in the third month of treatment, compared to controls. Treatment also increased its expression, mainly in this period, which tended to drop at the end of treatment. TGF- β production was higher in patients during at treatment. In a similar manner to our study, others have detected elevated levels of this cytokine in supernatant from cell cultures from pulmonary tuberculosis patients, which reduced at the end of treatment.⁶⁵ High TGF- β levels were also found in plasma and pleural fluid of patients before cure, in relation to healthy contactants, with a drop in its concentration after cure.⁸¹ As shown, our results agree with literature which reports that patients with pulmonary TB don't present a deficiency in TGF- β production in the active disease and during anti-tuberculosis treatment. During treatment, we can suggest that the high levels of this cytokine are regulating inflammatory activity, contributing to protect against the damage caused by exacerbated inflammatory response, as well as acting in the extracellular matrix deposition and fibrosis processes.

NO is considered one of the main mediators involved in mycobacterium destruction⁸³ and its generation is dependent on the iNOS enzyme.⁸⁴ In our study we observed an inhibition in gene expression of this enzyme during treatment compared to control individuals. Some studies have suggested that inhibition of iNOS expression and NO production can be considered as an escape mechanism for various infectious agents as in the case of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*.⁸⁵ Some *M. tuberculosis* antigens, such as CFP-10 and 19kDa protein, can act in function of macrophages, inhibiting their microbicidal capacity, creating a favourable environment for *M. tuberculosis* survival.⁸⁶ The mycobacterial cell wall component, Lipoarabinomanan(LAM), can directly inhibit phagolysosome fusion^{87,59}, and studies have suggested that the *Mycobacterium* can impede its recruitment for the phagolysosome, also characterising an escape mechanism for this bacteria.⁸⁸ Another fact which must be taken into account is that other microbicide mechanisms such as oxygen metabolites can be important in bacteria destruction, including the superoxide anion and hydrogen peroxide.⁸⁹

In conclusion, our results show that *M. tuberculosis* interacted with TLR2 and TLR4 receptors on the surface of monocytes and lymphocytes, and this interaction was probably responsible for inducing gene production of cytokines. Also, anti-tuberculosis treatment increased the expression of these receptors and the levels of pro and anti-inflammatory cytokines responsible for controlling infection and excess inflammation. We can therefore

suggest that anti-tuberculosis treatment not only acts to destroy the bacteria, but also modulates immune response.

Acknowledgements

The authors thank the patients and the healthy volunteers for their acceptance to participate in this study. We also thank the Infectious and Parasitic Diseases Services at Botucatu Medical School University Hospital – UNESP, Botucatu Teaching Health Centre, and Primary Healthcare units of Botucatu and the surrounding region.

Funding: This study has been supported by the FAPESP.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The study was approved by Botucatu Medical School – UNESP Research Ethics Committee. All participants provided a written informed consent before being enrolled into the study.

References

1. Focaccia R, Veronesi R. *Tratado de Infectologia* 3^a ed. Vol. 2. São Paulo: Atheneu, 2005.
2. World Health Organization Publications. <http://www.who.int/en/> WHO publications on tuberculosis. Tuberculosis facts – handout 2010. Available from: <http://www.who.int/tb/en>
3. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice: latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1860-1866.
4. Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 2003; 5: 159-67.
5. Ladel CH, Szalay G, Reidel D, Kaufmann SHE.. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Infect. Immun* 1997; 65: 1936–38.

6. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol* 1997; 159: 635–43.
7. Denis M, Gregg EO, Ghandirian E. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int. J. Immunopharmacol* 1990; 12: 721-7.
8. Eun-Kyeong J, Jeong-Kyu P, Hazel MD. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 205-10.
9. Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J. Clin. Invest* 1999; 103:1023–29.
10. Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM, Kornfeld H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun* 1997; 65:5149–56.
11. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679-91.
12. Kaufmann SHE. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum* 2002; 61: 1154-58.
13. van de Veerdonk FL, Teirlinck AC, Kleinnijenhuis J, Kullberg BJ, van Crevel R, van der Meer JWM, Joosten L AB, Netea MG. *Mycobacterium tuberculosis* induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1. *Journal of Leukocyte Biology* 2010; 88: 227-232.
14. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010; 21: 455–462.
15. Bettelli E, Korn T, Kuchroo V. Th17: the third member of effector T cell trilogy. *Current Opinion in Immunology* 2007; 19: 652-657.

16. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995; 3: 811–21.
17. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 2009; 31: 799–810.
18. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467- 476.
19. Van Crevel R, Ottenhoff TH, Van Der Meer JW. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 294-309.
20. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavolon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation between the Kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89: 26-33.
21. Lasco TM, Cassone L, Kamohara H, Yoshimura T, McMurray DN. Evaluating the role of tumour necrosis factor-alpha in experimental pulmonary tuberculosis in the guinea pig. *Tuberculosis* 2005; 85: 254-8.
22. Juffermans NP, Verbon A, Van Deventer SJH, Buurman WA, Van Deutekon H, Speelman P, et al. Tumour necrosis factor and interleukin-1 inhibitors as markers of disease activity of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1328-31.
23. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449: 819-26.
24. Juarez E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respiratory Research* 2010; 11: 1-13.

25. Doherty TM, Arditi M. TB, or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? *J Clin Invest* 2004; 114: 1699-703.
26. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, et al. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 1036-44.
27. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 1999; 285: 732-5.
28. Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. The DC14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol* 1999; 163: 6748-55.
29. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999; 163: 3920-7.
30. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle JT, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor 2- dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2001; 167: 910-8.
31. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999; 274: 33419-25.
32. Drage MG, Pecora ND, Hise AG, Febbraio M, Silverstein RL, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol* 2009; 258(1): 29–37.
33. Underhill Dm, Ozinsky A, Smith KD, Adreem A. Tol-like receptor-2 mediates mycobacterial induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14459-63.

34. Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse toll like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 20961–20967.
35. Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *Journal of Immunology* 2000; 164: 558–561.
36. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Van Crevel R. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Developmental Immunology* 2011; 2011: 405310.
37. Khan N, Alam K, Mande SC, Valluri VL, Hasnain SE, Mukhopadhyay S. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 60 modulates immune response to PPD by manipulating the surface expression of TLR2 on macrophages. *Cellular Microbiology* 2008; 10: 1711–1722.
38. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97:7.
39. Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning C *et al.* Toll-like receptor TLR2- and TLR4- mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. immunol* 2002; 169: 3480-4.
40. Abel B, Thieblemont N, Ousniaux VJ, Brown N, Mpagi J, miyagi k *et al.* Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J immunol* 2002; 169: 3155-62.
41. Mansson A, Adner M, Cardell LO. Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respiratory Research* 2006; 7: 36.
42. Prabha C, Rajashree P, Sulochana DDas. TLR2 and TLR4 expression on the immune cells of tuberculous pleural fluid. *Immunology Letters* 2008; 117: 26–34.

43. Beatty WL. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* 2000; 1: 235–247.
44. Beatty WL, Ullrich HJ, Russell DG. Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. *Eur. J. Cell Biol* 2001; 80: 31–40.
45. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 2007; 110: 3234–3244.
46. Lancioni CL, Li Q, Thomas JJ, Ding X, Thiel B, Drage MG, Pecora ND, Ziady AG, Shank S, Harding CV, Boom WH, Rojas RE. *Mycobacterium tuberculosis* Lipoproteins Directly Regulate Human Memory CD4₊ T Cell Activation via Toll-Like Receptors 1 and 2. *Infection and Immunity* 2011; 663–673.
47. Schmitz ML, Krappmann D. Controlling NF- κ B activation in T cells by costimulatory receptors. *Cell Death Differ* 2006; 13: 834–842.
48. Sugawara I, Yamada H, Li C, Mizuno S, Takeuchi O, Akira S. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol. Immunol* 2003; 47: 327–336.
49. Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Fremont C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am. J. Pathol* 2004; 164: 49–57.
50. Branger J, Knapp S, Weijer S, Leemans JC, Pater JM, Speelman P, Florquin S, Van der Poll T. Role of Toll-like receptor 4 in Gram-positive and Gram-negative pneumonia in mice. *Infect. Immun* 2004; 72: 788–794.
51. Chackerian AA, Perera TV, Behar SM. Gamma- interferon producing CD4-T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun* 2001; 69: 2666–2674.

52. Saklatvala, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr. Opin. Pharmacol* 2004; 4: 372–377.
53. Chang JS, Huggett JF, Dheda K, Kim LU, Zumla A, Rook GAW. *Mycobacterium tuberculosis* Induces Selective Up-Regulation of TLRs in the Mononuclear Leukocytes of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *J Immunol* 2006; 176: 3010-3018.
54. Munk ME, Mayer P, Anding P, Feldmann K, Kaufmann SHE. Increased Numbers of Interleukin-12-Producing Cells in Human Tuberculosis. *Infection and Immunity* 1996; 1078–1080.
55. Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, Son JW, Harding CV, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Song CH, Jo EK. The Mycobacterial 38-Kilodalton Glycolipoprotein Antigen Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway and Release of Proinflammatory Cytokines through Toll-Like Receptors 2 and 4 in Human Monocytes. *Infection and Immunity* 2006; 2686–2696.
56. Verbon A, Juffermans N, Van Deventer SJ, Speelman P, Van Deutekom H, Van Der Poll T. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin Exp Immunol* 1999; 115(1):110-3.
57. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun* 2007;75(2):820-9.
58. Dlugovitzky D, Bay ML, Rateni L, Fiorenza G, Vietti L, Farroni MA, et al. 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(3): 343-9.
59. Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe* 2008; 3(6): 399-407.

60. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, *et al.* Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacillie Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med* 1996; 335 : 1956-61
61. Deveci F, Akbulut HH, Trugut T, Muz MH. Changes in serum cytokine levels in active tuberculosis with treatment. *Mediators Inflamm* 2005;5: 256-62.
62. Jo EK, Park JK, Dockrel HM. Dynamics of cytokine in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 205-10.
63. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent TH2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun* 1996; 64: 1351–56.
64. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun* 1995; 63:3231–34.
65. Peresi E, Silva SMUR, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. *J Bras Pneumol* 2008; 34: 942-949.
66. Moreno C, Taverne J, Mehlert A, *et al.* Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 240–5
67. Aung H, Toossi Z, Wisnieski JJ, *et al.* Induction of monocyte expression of tumor necrosis factor alpha by the 30-kD alpha antigen of *Mycobacterium tuberculosis* and synergism with fibronectin. *J Clin Invest* 1996; 98:1261–8.
68. Youmans GP. Mechanisms of immunity in tuberculosis. *Pathobiol Annu* 1979; 9: 137–62.
69. Koch R. Weitere Mittheilungen u`ber ein Heilmittel gegen Tuberculose. *Dtsch Med Wochenschr* 1890; 16: 1029.

70. Karnofsky DA, Burchenal JH. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: MacLeod CM, ed. Evaluation of agents. Proceedings of Symposium at the New York Academy of Medicine. New York: *Columbia University Press* 1949; 191–205.
71. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Pignet PF, Vassalli P. The inducing role of tumour necrosis factor in the development of bactericidal during BCG infection. *Cell* 1989; 56: 731–40.
72. Bermudez LEM, Young LS. Tumour necrosis factor alone or in combination with IL-2, but not IFN- γ , is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J Immunol* 1988; 140: 3006–13.
73. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumour necrosis factor. *N. Engl J Med* 1987; 316: 379–85.
74. Lawn SD, Obeng J, W. Acheampong J, Griffin GE. Resolution of the acute-phase response in West African patients receiving treatment for pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4(4): 340–344.
75. 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 CD41 T Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 734–742.
76. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis* 2004; 190: 624–631.
77. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol. Immunol* 2007; 51: 1139–1147.
78. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J. Immunol* 2007; 178: 3786–3796.

79. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol* 2006; 177: 4662–4669.
80. Peng M, Wang Z, Yao C, Jiang L, Jin Q, Wang J, Li B. Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Increased in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *Cellular & Molecular Immunology* 2008; 5: 203-208.
81. Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Egual 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.
82. Maruyama T, Konkel JE, Zamarron BF, Chen W. The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin Immunol* 2011.
83. Yuhas Y, Berent E, Cohen R, Ashkenazi S. Roles of NF- κ B Activation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Inhibition in the Effect of Rifampin on Inducible Nitric Oxide Synthase Transcription in Human Lung Epithelial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 1539–1545.
84. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol* 1997; 15: 323–350.
85. Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M. Localization of CORO1A in the Macrophages Containing Mycobacterium leprae. *Acta Histochem Cytochem* 2006; 39 (4): 107–112.
86. Gupta D, Sharma S, Singha J, Satsangi AT, Antony C, Natarajan K. Suppression of TLR2-Induced IL-12, Reactive Oxygen Species, and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Mycobacterium tuberculosis Antigens Expressed inside Macrophages during the Course of Infection. *J Immunol* 2010;184: 5444-5455.

87. Chan J, Fan X, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR . Lipoarabinomannan, a Possible Virulence Factor Involved in Persistence of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages. *Infection and Immunity* 1991; 1755-1761.
88. Miller BH, Fratti RA, Poschet JF, Timmins GS, Master SS, Burgos M, Marletta MA, Deretic V. Mycobacteria Inhibit Nitric Oxide Synthase Recruitment to Phagosomes during Macrophage Infection. *Infection and Immunity* 2004; 2872–2878.
89. Selek S, Aslan M, Horoz M, Celik H, Cosar N, Gunak F, Kocyigit A. Peripheral DNA Damage in Active Pulmonary Tuberculosis. *Environmental Toxicology* 2011; doi: 10.1002/tox.20674.

Legends

Figure 1A, B, C, D: Gene mRNA expression for TLR2 (A), TLR4 (B) receptors, Mean percentages of CD3⁺(C) and CD14⁺(D) cells expressing TLR2, coexpressing TLR2 and TLR4, and expressing TLR4 in PBMCs from control individuals (G1) and pulmonary tuberculosis patients (G2) during anti-tuberculosis treatment, M1 (up to one month of treatment); M2 (three months of treatment); M3 (end of treatment). Results are expressed as mean \pm S.E.M. *p<0.05 compared to G1; # p<0.05 compared to M2 and M3; ° p<0.05 compared to M1 and M2; Δ p<0.05 compared to M1.

Figure 2A, B, C, D, E, F, G, H: Gene mRNA expression and production of IL-12 (A, B), IFN- γ (C, D), TNF- α (E, F), IL-17 (G, H) in the control group (G1) and patients group during anti-tuberculosis treatment (G2), M0 (without treatment), M1 (up to one month of treatment); M2 (three months of treatment); M3 (end of treatment). Results are expressed as mean \pm S.E.M (standard error of mean). *p<0.05 compared to G1; # p<0.05 compared to M1.

Figure 3A, B, C, D: Gene mRNA expression and production of IL-10 (A, B) and TGF- β (C, D) in the control group (G1) and patients group during anti-tuberculosis treatment (G2), M1 (up to one month of treatment); M2 (three months of treatment); M3 (end of treatment). Results are expressed as mean \pm S.E.M (standard error of mean). *p<0.05 compared to G1.

Figure 4: Gene mRNA expression of iNOS in the control group (G1) and patients group during anti-tuberculosis treatment (G2), M1 (up to one month of treatment); M2 (three months of treatment); M3 (end of treatment). Results are expressed as mean \pm S.E.M (standard error of mean). *p<0.05 compared to G1; # p<0.05 compared to M1.

Table 1. Primers for cytokines, Beta- actin e receptors TLRs

Gene	Reverse Sequence	Forward Sequence	GenBank	Product Length
IL-12	CTCCTGCCTCATCCTCCTGAA	CAGCCTGGGAAACATAACAAGAC	NM_002187.2	109
IFN-γ	GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA	AGCTCTGCATCGTTTTGGGTT	NM_000619.2	118
TNF-α	GATGATCTGACTGCCTGGGC	CACGCTCTTCTGCCTGCTG	NM_000594.2	105
IL-17	GGATTTTCGTGGGATTGTGAT	TGGGAAGACCTCATTGGTGT	NM_002190.2	84
IL-10	TCATCTCAGAACAAGGCTTGGC	CGAGATGCCTTCAGCAGAGTG	NM_000572.2	128
TGF-β	TCCAGGCTCCAAATGTAGG	GGACACCAACTATTGCTTCAG	NM_000660.4	150
TLR-2	GGTCTTGGTGTTTCATTATCTTC	TCTCCCATTTCCGTCTTTTT	NM_003264.3	125
TLR-4	TCTGCTGCAACTCATTTCAT	CCGCTTCCTGGTCTTATCAT	NM_138554.3	141
β-actin	AAGGGACTTCCTGTAAACAATGCA	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	NM_001101.3	140

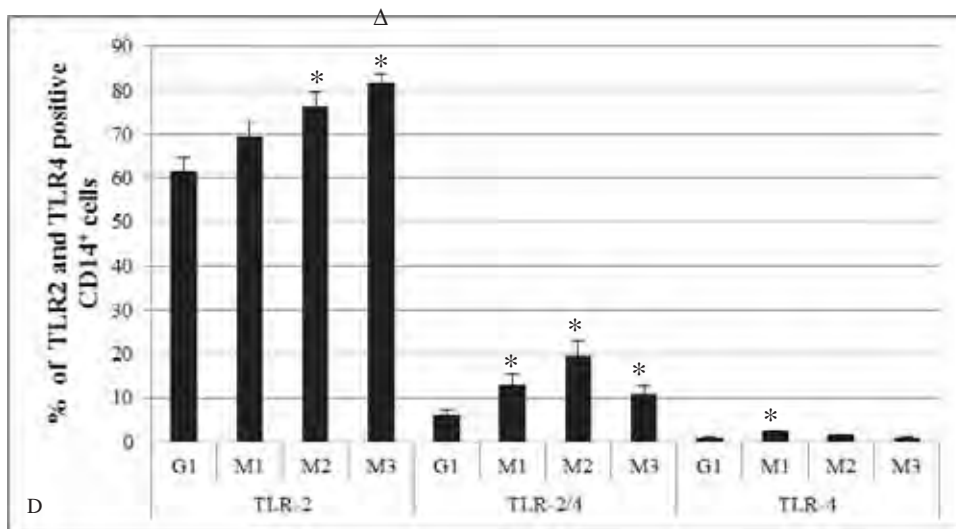
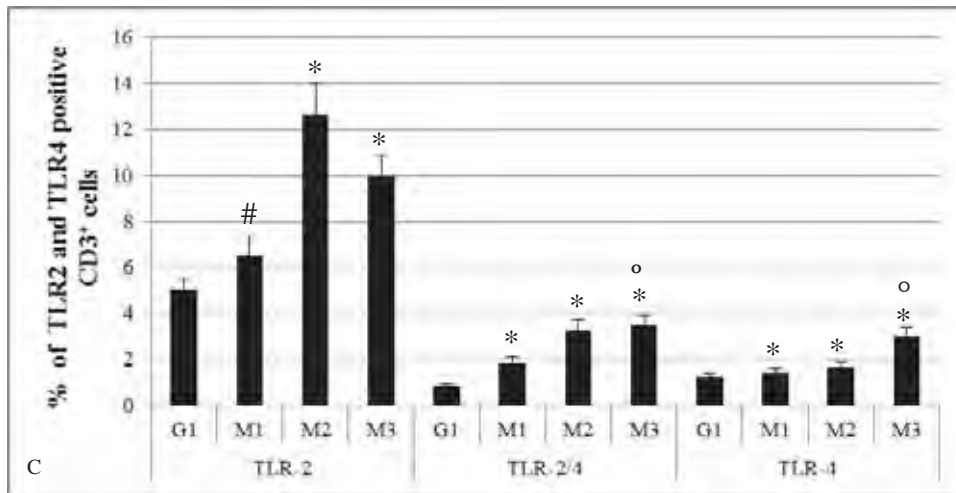
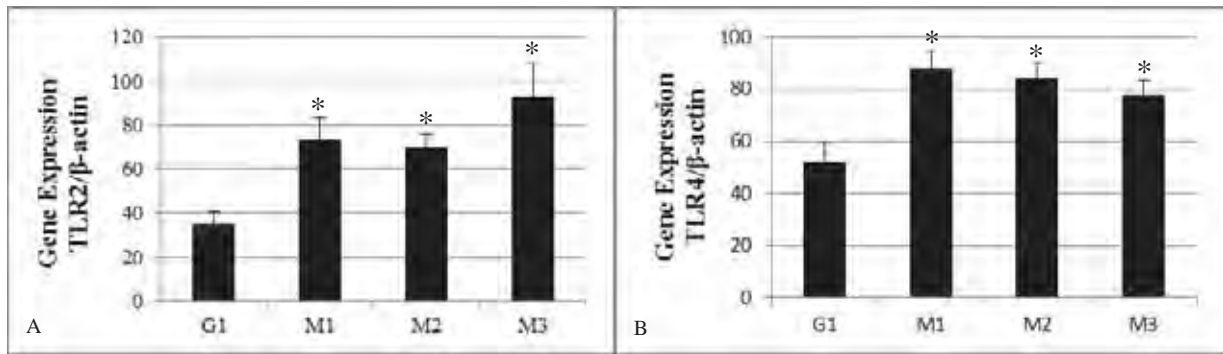


Figure 1A, B, C, D

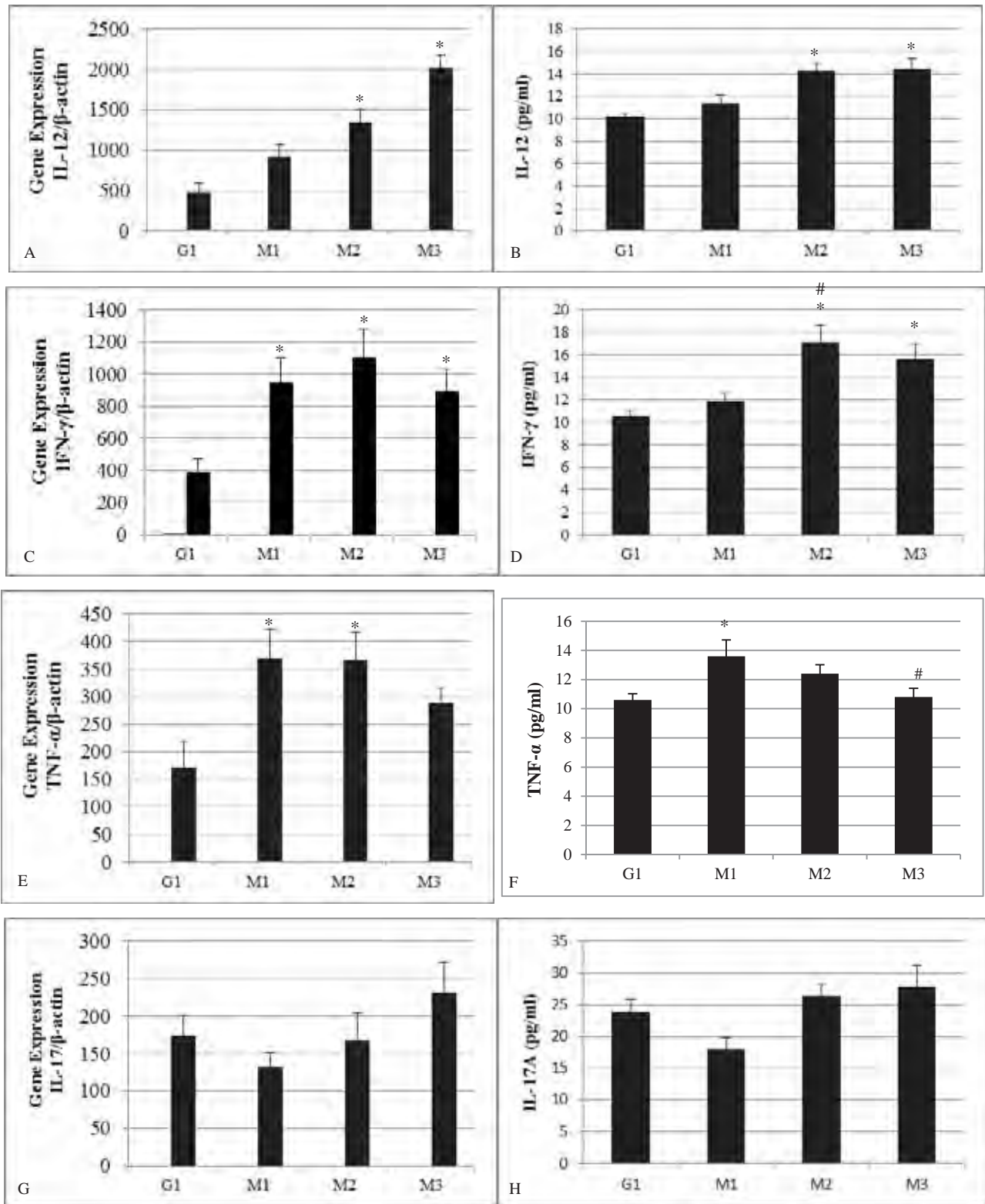


Figure 2A, B, C, D, E, F, G, H

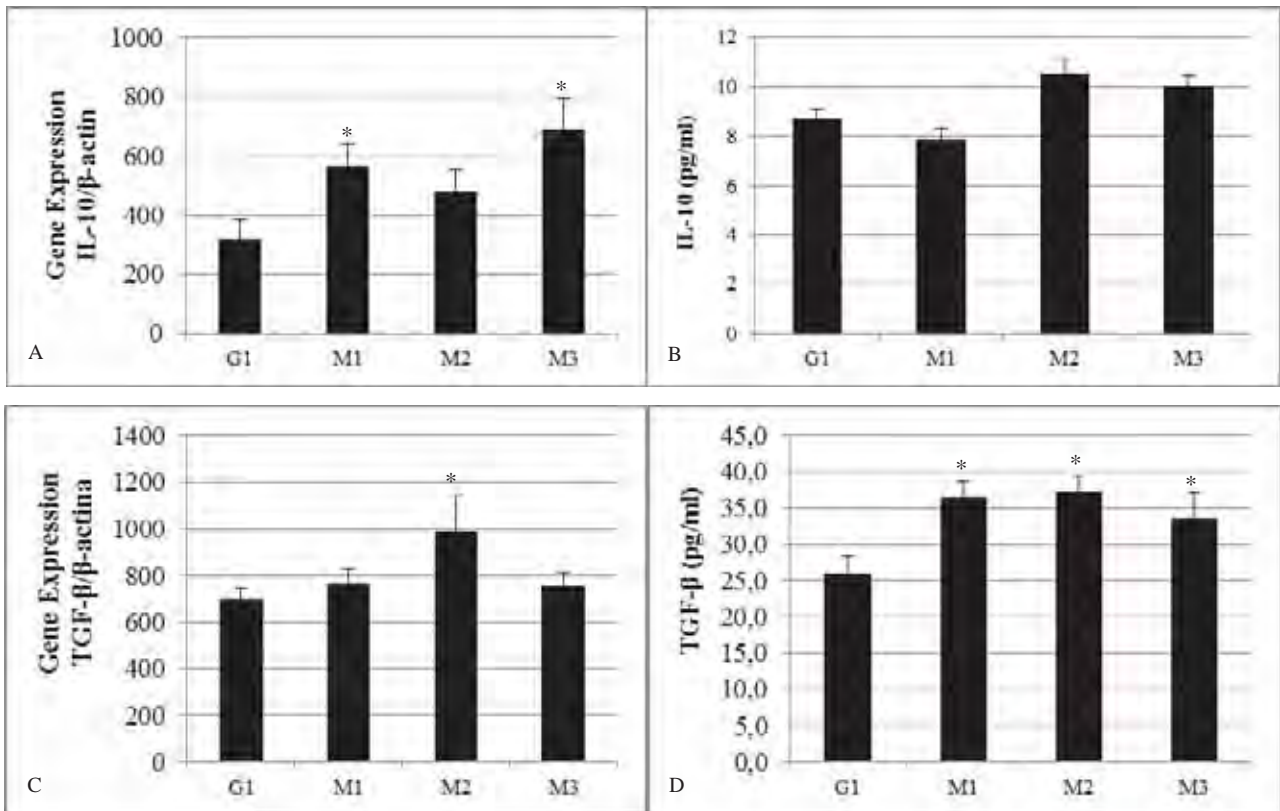


Figure 3A, B, C, D

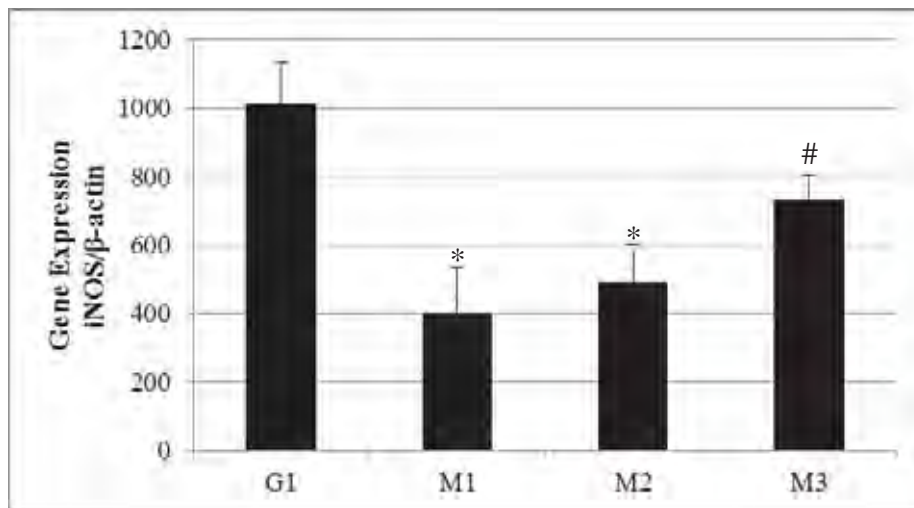


Figure 4

4.2. Artigo 2: Submetido para a revista *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

DNA damage in cell of patients during anti-tuberculosis treatment

Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira ⁽¹⁾, Eliana Peresi ⁽¹⁾, Francilene Tavares Capel ⁽¹⁾, Camila Renata Corrêa ⁽²⁾, Damiana Tortolero Pierine ⁽²⁾, Sueli Aparecida Calvi ⁽¹⁾

1. Department of Tropical Diseases, Botucatu School of Medicine – UNESP, São Paulo State University, Brazil

2. Department of Internal Medicine, Botucatu School of Medicine – UNESP, São Paulo State University, Brazil

* Corresponding author at: Tropical Diseases Department, Botucatu Medical School – UNESP, Sao Paulo State University, Distrito de Rubiao Junior CEP, 18618-000, Botucatu, Sao Paulo, Brazil. Tel.: +55 14 3811 6372/6212. E-mail address: larissaragozo@yahoo.com.br (L.R.C. de Oliveira).

Abstract

Tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease and one of the biggest causes of morbidity and mortality worldwide. The expression of iNOS with the consequent production of NO during the inflammatory process is an essential part of bacteria destruction. There are no studies on peripheral DNA damage in TB patients on anti-tuberculosis treatment and its association with oxidative stress. Thus the objective of this study was to investigate whether pulmonary TB patients undergoing anti-tuberculosis treatment suffer DNA damage and if this damage is related to oxidative stress, by evaluating total hydrophilic antioxidant capacity and iNOS expression. Peripheral blood mononuclear cells from pulmonary TB patients on anti-TB treatment and healthy PPD⁺ controls were used to evaluate DNA damage by single-cell gel electrophoresis (Comet Assay), and quantify iNOS expression by qPCR. We also evaluated total hydrophilic antioxidant capacity in plasma from patients and controls. Pulmonary TB patients under treatment presented increased DNA damage compared to controls, which diminished during treatment. Similarly, the antioxidant capacity of these individuals was increased at the start of treatment in relation to controls, and reduced during treatment. As for iNOS expression, TB patients presented expression inhibition of this enzyme in relation to controls, but during treatment it tended to increase, but was still lower than controls. In conclusion, our results indicate that pulmonary TB patients under treatment present DNA damage in peripheral blood mononuclear cells. However, this damage isn't related to nitric oxide, but is due to elevated antioxidant enzyme activity probably associated with other free radicals.

Keywords: DNA damage, tuberculosis, antioxidants, iNOS

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease with chronic evolution; its a etiological agent is intracellular bacteria *Mycobacterium tuberculosis* [1]. The World Health Organization (WHO) [2] estimates that one third of the world population are infected by the bacillus, with 9.4 million new cases and 1.7 million deaths from the disease every year. Tuberculosis is lethal without treatment which is fundamentally chemotherapy, drastically reducing mortality, reducing the transmissible period, and when used prophylactically, prevents sickening, and is thus a very import tool in disease control [1]. There are currently four first-line antimicrobials, isoniazid, ethambutol, pyrazinamide, and rifampicin, which are reasonably effective in treating individuals with active tuberculosis, but they are inefficient during the latent stage of the disease [3,4]. In general, anti-tuberculosis drugs act by enzymatic interference or by blocking protein synthesis.

Pulmonary TB mainly occurs in immunocompetent adults, being a chronic infectious process associated with extensive lung tissue remodelling with the formation of granuloma containing the live bacterium as well as lymphoid and myeloid cells. The formation and maintenance of granuloma are mediated by active immune response [5,6,7]. The initial defence mechanism against *M. tuberculosis* involves phagocytosis of the microorganism by alveolar macrophages. After this process, IL-12 is then produced by macrophages and dendritic cells, which stimulate the development of a Th1 response to produce IFN- γ and TNF- α [8,9]. TNF- α in synergy with IFN- γ and mycobacterial products activate macrophages, resulting in the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen intermediates (RNI) [5,6,7]. NO is synthesized when L-arginine is converted into L-citrulline by the enzyme synthase activity of inducible nitric oxide (iNOS) [10], considered the main microbicidal mechanism involved in micobacteria destruction. NO can react with oxygen to produce a variety of products including NO_2^- and NO_3^- , and with superoxide to produce ONOO^- [11]. NO and ROS can modify DNA bacterial, lipid, and protein, both host and microorganism. Other potential mechanisms for bacteria destruction by NO include interactions with accessory proteins as targets, such as as iron-sulfur groups, heme groups, thiols, aromatic or phenolic residues, tyrosyl radicals, and amines. These reactions result in enzymatic inactivation and/or other protein malfunctions [12]. Expression of iNOS the consequent generation and production of NO during the inflammatory process is essential for destroying ingested bacteria, however, when this metabolite is produced in high quantities, it

can cause damage to host cells, and induce alterations in their DNA. The accumulation of DNA damage can cause mutagenic or carcinogenic changes in host cells [13].

In this way DNA damage can be mainly caused by oxidative stress [14,15], and inflammation [16]. This process can cause [17] extensive damage in host tissue, and can be associated to a genome damage. In experimental infection caused by *L. chagasi* and *T. cruzi*, DNA damage detected in spleen cells was correlated with elevated NO production [18,19]. In patients with active TB, an association was observed between oxidative stress and DNA damage [20]. Also, other studies have shown that *M. leprae* leads to the production of oxygen radicals, such as hydrogen peroxide and peroxidase, by neutrophils in blood of infected individuals, which performed genotoxic activity [21]. So infection by *M. tuberculosis* could cause mutations in DNA, which can be linked to alterations in immune response, and responsible for an increased susceptibility to malignant transformations [22]. The coexistence of pulmonary TB and carcinoma was initially described by Bayle in 1810. Studies have demonstrated an association between metastatic lung squamous cells and cavitory TB lesions [23,24].

Comet assay (single-cell gel electrophoresis) is a method used to evaluate genotoxic alterations and primary lesions in DNA. It is a fast, simple, sensitive method of determining the levels of DNA damage in different situations [18]. Thus, the objective of this study was to investigate whether pulmonary tuberculosis patients submitted to anti-TB treatment presented DNA damage in peripheral blood mononuclear cells using the Comet assay. We also investigated whether DNA damage was related to oxidative stress by evaluating total hydrophilic antioxidant capacity (THAC) and iNOS expression.

2. Patients and Methods

2.1. Patients

The study recruited pulmonary tuberculosis patients attending the Infectious and Parasitic Diseases Services at Botucatu Medical School University Hospital – UNESP, Botucatu Teaching Health Centre, and Primary Healthcare units in Botucatu and the surrounding region, and healthy individuals working in health areas at Botucatu Medical School University Hospital. The tuberculosis patients were diagnosed using information about contact with TB, medical history, and clinical symptoms (cough, haemoptysis, thoracic pain, fever, and weight loss), presence of alcohol-acid resistant bacilli by bacilloscopy, and those

who had symptoms characteristic of pulmonary TB in thoracic x-rays. Exclusion criteria were patients with extra-pulmonary TB, HIV-positive individuals or those with other immunodeficiencies, patients with other granulomatous, autoimmune diseases, or cancer, and pregnant women. Controls were healthy adults without clinical pulmonary tuberculosis, health area professionals from Botucatu Medical School University Hospital, and with PPD⁺. The PPD test consists of an intradermic injection of 0.1ml (2U) of derived purified protein. Hardening ≥ 5 mm, measured 72h later was considered positive. In total, 20 controls (G1) and 19 pulmonary TB patients (G2) (13 males and 6 females, mean aged 49 and 37 years, respectively) were studied. In this group measurements were taken at three times: **M1**- patients with up to one month of anti-tuberculosis treatment; **M2**- in the third month of treatment; **M3**- at the end of six months treatment. The study was approved by Botucatu Medical School – UNESP Research Ethics Committee. Signed free informed consent forms were obtained from all individuals. Patients were treated for six months using the standard RIPE (rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol,) scheme.

2.2. Blood sample collection

Blood samples (20ml) were collected from the forearm vein at one moment in the controls and three different moments in the pulmonary TB patients. Samples were collected in heparinized tubes and initially centrifuged at 1500 g for 10 minutes to obtain plasma for measuring antioxidant capacity and total hydrophilic. Remaining blood samples were used to obtain peripheral blood mononuclear cells for later evaluation of DNA damage and iNOS expression.

2.3. Harvesting total mononuclear cells from peripheral blood

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Histopaque^R gradient separation [25]. The lymphocyte and monocyte rich ring was washed with PBS for 15 minutes at 1500 rpm. The cell suspension was then re-suspended in PBS. Cell identification and viability was performed by Turk count. Then 2×10^6 /ml cell concentrations were obtained for the remaining protocols.

2.4. Genotoxic alterations

The protocol for detecting genotoxic alterations in PBMCs was as described by Sasaki et al. [26] with some modifications. After obtaining PBMC as described in Item 2.3, 10 μ l of cell suspension was added to 120 μ l 0.5% low melting point agarose at 37°C, this mixture was then placed on slides previously covered with 1.5% agarose, and covered with coverslips. After agarose solidification in a refrigerator, the slides were removed and immersed in a lysis buffer solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl buffer, pH10, 1% sodium sarcosinate with 1% Triton X-100, and 10% DMSO) for 1h. Firstly for electrophoresis, slides were washed in PBS, placed in alkaline solution (pH>13) for 20 minutes, and submitted to electrophoresis for 20 minutes at 25V/cm and 300mA. After electrophoresis, the slides were neutralised with 0.4M Tris-HCl buffer (pH7.5), fixed in absolute ethanol, and stored for analysis. Independently, positive controls (PBMCs) were treated with 100 μ M H₂O₂ for 5 minutes in triplicate, to guarantee assay sensitivity and reproducibility. All steps were performed under low light conditions. Slides were stained with SYBRGreen (10mg/mL) and 100 nucleoids per slide were examined at 400x magnification using an immunofluorescence microscope connected to an image analysis system (Comet Assay II, Perceptive Instruments, Haverhill, Suffolk, UK). DNA damage was measured by analysis of tail intensity (% migrated DNA) and tail moment [the product of tail length (DNA migration) and fraction of DNA in the comet tail, i.e. % DNA in the tail] [27]. As the groups showed statistical differences between these parameters, we chose tail moment to present our results.

2.5. Total hydrophilic antioxidant capacity (THAC) in plasma

The protocol for performing THAC was as described by Beretta et al. [28]. Plasma (100 μ l) was diluted in 300 μ l cold PBS (pH 7.4). After dilution, 100 μ l of BODIPY (fluorescent oxidizable substance) was added to all samples. The samples were then homogenised for 10 s and incubated in a bain-marie at 37 °C for 10 minutes, protected from light. During this stage the AAPH (free radical generator) was prepared. After incubation, 420 μ l PBS pH 7.4 T.A. was added and 80 μ l AAPH was added to all samples and quickly agitated. Samples were placed in triplicate in 96 well plates, which were run for 4 hours with a 5 minute reading interval in a Victor X2 plate reader and software (Perkinelmer 2030 Manager) Results were expressed by calculating above the curve.

2.6. Quantification of genic expression of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

Total RNA was extracted from PBMCs (obtained as per Item 2.3), 2×10^6 cells/ml at the different moments (M1 to M3) by the TRIZOL method (GibcoBRL, São Paulo, Brazil). RNA concentration was determined by 260 nm absorbance; all samples showed an absorbance value of approximately 2.0. One microgram of RNA was used for the synthesis of 20 μ L of complementary DNA (cDNA) by SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, São Paulo, Brazil); iNOS mRNA levels were determined by real-time PCR. Primer sequences were: iNOS forward, 5'-ATAGAGGATGAGCTGAGCATTC-3' and reverse, 5'-GCGTTACTCCACCAACAATGGCAA-3' (GenBank ID: **NM_000625.4**) and β -Actin was used as internal control and the sequences were: forward, 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' and reverse 5'-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3' (GenBank ID: **NM_001101.3**). Quantitative measurement was performed using an SYBR Green qPCR kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions on an ABI Prims 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems). The real-time cyclers conditions were as follows: 95°C for 10 minutes, followed by 40 annealing cycles at 95°C for 15s and extension at 60°C for 1 minute, with the fluorescence signals acquired in the annealing and extension steps of the amplification cycle (60°C for 1 minute). Product purity was confirmed by dissociation curve analysis. Gene expression was quantified relative to the values of the control group after adjusting for β -Actin. Samples from each moment (M1-M3), from each group (G1 and G2) were analysed in duplicate. Results were presented as increase or decrease in gene expression.

2.7. Statistical Analysis

To compare genic expression of iNOS by qPCR, genotoxic alterations by Comet assay, and THAC in time, a repeated measurements in time model was adjusted using the mixed procedure in SAS software. To compare genic expression of iNOS by qPCR, genotoxic alterations by Comet assay, and THAC with the control group, a generalised linear model was adjusted according to gamma distribution. The adjustment was made using the Genmod procedure in SAS for Windows Version 9.2. Considering a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

Figure 1 shows DNA damage levels (tail moment) in PBMC from control individuals (G1) and pulmonary TB patients (G2) at three different treatment moments. PBMCs from TB patients (G2) at the start (M1) and third month (M2) of treatment showed a significant increase in DNA damage compared to controls (G1) ($p < 0.0001$ and $p = 0.03$ respectively). At the end of treatment (M3) DNA damage tended to reduce in relation to controls (G1). Also, no significant differences were detected in DNA damage in the different treatment moments.

To establish whether this damage was related to oxidative stress, experiments were performed to detect iNOS expression and THAC in control individuals and patients during treatment. Figure 2 shows a significant increase in iNOS expression at the end of treatment (M3) ($p = 0.03$) in relation to M1, but no significant differences were detected between these two moments M1 and M2. Comparison between groups (G1 and G2) showed a significant reduction in this enzyme occurred at M1 ($p = 0.012$) and M2 ($p = 0.03$) in TB patients (G2) in relation to controls (G1). At the end of treatment (M3), although no significant differences were detected between the two groups, iNOS expression tended to be augmented, but to be lower in patients.

Figure 3 shows no significant differences existed in antioxidant capacity between the different treatment moments in patients with pulmonary TB, although at the start of treatment (M1) there was an increase in THAC (Figure 3). Comparison between groups showed a significant increase in THAC ($p = 0.04$) at the start of treatment (M1) in TB patients (G2) compared to controls (G1). In the third month (M2) and at the end (M3) of treatment, this activity dropped, but it was still higher than in G1, but without significant difference.

4. Discussion

In this study we investigated whether mononuclear cells in pulmonary tuberculosis patients in anti-tuberculosis treatment presented damage in DNA. Our results showed that individuals with pulmonary TB presented a significant increase in DNA damage in peripheral blood mononuclear cells compared to healthy controls at the start of anti-TB treatment. Our results also showed that the DNA damage tended to decrease during treatment. These results agree with other studies which verified increased DNA damage in cells from patients with pulmonary [20,29-31] and pleural [32] tuberculosis. However, this is the first report in respect of genotoxic alterations in pulmonary TB patients during treatment. The origin of this damage

could be intimately linked to the increase in oxidative stress related to chronic inflammation [20]. In this sense, cells subjected to oxidative stress can suffer severe metabolic dysfunctions such as membrane lipid peroxidation, nicotinamide nucleotide depletion, cytoskeletal rupture, and DNA damage [15]. Studies with *in vitro* cell cultures have shown that *M. tuberculosis* causes DNA fragmentation and promotes apoptosis of human alveolar macrophages [33, 34]. From our results we can therefore suggest that the increase in DNA damage at the start and drop at the end of treatment was initially due to higher bacterial stimulations, with a consequent increase in inflammatory process and oxidative stress, a process which was reversed with treatment.

Infection by *M. tuberculosis* activates a chronic inflammatory process mediated by macrophages and T cells with the subsequent formation of granuloma. After infected aerosol inhalation, alveolar macrophages are the first cells to encounter the Mycobacterium, causing activation of these cells with the consequent initial liberation of IL-12 which activates T cells to produce IFN- γ and TNF- α , which activate infected macrophages, increasing their microbicide activity [35]. In this way, activation of inflammatory cells can generate reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, important mediators related with host defence in tuberculosis patients [36]. However, these reactive species not only cause destruction of various infectious agents, but large quantities can induce oxidative stress and cause DNA damage in other cells or tissues [36]. Tuberculosis studies have shown that NO, whose generation is dependent on the iNOS enzyme, is one of the main microbicide mechanisms involved in controlling *M. tuberculosis* [37].

Faced with our results and what they showed, our next objective was to verify whether the DNA damage was related to oxidative stress by evaluating iNOS expression and THAC. Our results on iNOS expression in TB patients during treatment, showed an inhibition of gene expression from this enzyme compared to controls. However, when we evaluated iNOS expression in patients, our results showed that it tended to increase during treatment. Detection of low expression of this enzyme agrees with the results of other studies that also show a reduction in iNOS expression and NO production, and suggest that this inhibition could be related to the escape mechanism of various infectious agents as occurs in infection caused by *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* [38]. Some *M. tuberculosis* antigens, such as CFP-10 and 19kDA protein, can act in macrophage functioning, inhibiting its microbicide capacity, creating a favourable environment for *M. tuberculosis* survival [39]. The mycobacterial cell wall component, Lipoarabinomannan (LAM), can directly inhibit phagolysosome fusion [40,41], and studies have suggested that the mycobacteria can impede

the recruitment of this enzyme for the phagolysosome, thus characterizing an escape mechanism for this bacteria [11]. On the other hand, it has been shown that rifampicin, as well as chemotherapy for treating tuberculosis, is also considered an immunomodulator able to increase iNOS expression and NO production via NF- κ B [42]. These studies may explain our results, in that perhaps low iNOS expression could be due to a mycobacterial escape mechanism directly inhibiting some macrophage functions, or also by the existence of suppressor mechanisms, which inhibit the production of adequate levels of some cytokines responsible for efficient macrophage activation, a process reversed by treatment [20]. Therefore from our results we cannot link DNA damage with iNOS expression, which is fundamental for producing NO. However, we can suggest that this damage is caused by other free radicals and oxidants such as the superoxide anion, nitrogen dioxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid, which are produced to combat various infectious agents such as *M. tuberculosis*. Also, some studies have demonstrated increased hydrogen peroxide in pulmonary tuberculosis [43].

In response to acute and chronic increases in oxidative stress, cells have adaptation mechanisms to increase antioxidant defences. Antioxidant enzymes, including isoforms of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT), were found to be induced in different cells in response to oxidative stress [44]. It has also been suggested that a reduction in the activity of these enzymes could be intimately linked to increased DNA damage [45]. Studies have shown a reduction in antioxidant enzymes in cancerous tissues [46]. Also, a study performed in Ethiopia with pulmonary TB patients showed a correlation between a reduction in circulating antioxidant agents and increased lipid peroxidation [29]. However, our results showed increased activity for these enzymes in pulmonary TB patients at the start of treatment, which reduced in the third and sixth month of treatment. Probably, this increase in antioxidant enzyme activity is related to the increase in free radicals at the start of infection in an attempt to combat it, but as already mentioned, we did not manage to link the damage with reactive nitrogen species, the increase in antioxidant enzymes reinforces the idea of the existence of oxidative stress which in our study could have been caused by other free radicals. In line with our results, other authors have also observed an increase in gene expression of antioxidant enzymes such as GPx, CAT, CuZnSOD, and MnSOD in skeletal muscle cells exposed to oxidative stress. This increase was dependent on exposure time to pro-oxidant agents, which correlated with increased cell damage due to treatment with oxidants [47]. It has also been shown increased MnSOD and GPx expression in rat lungs under oxidative stress conditions [48], and higher CAT induction in response to H₂O₂ in lung

epithelial cells [49]. Zhou et al. [50] showed that transcription factors such as NF- κ B and AP-1 are activated by oxidative stress, and are potent activation mediators of gene antioxidant enzyme expression in skeletal muscle cells under oxidative stress.

The coexistence of pulmonary tuberculosis and carcinoma has been described in various studies which report that pulmonary TB can coexist with a variety of histological types of lung cancer [23]. A close association has also been seen between squamous metastatic carcinoma cells (SCC) from lungs with large cavitory TB lesions [23]. A study in India reported that active and latent TB lesions were found in the lungs of 30-33% of patients with bronchogenic tumours compared with 7% in the population in general [51], while others have reported high coexistence indexes for pulmonary TB and lung cancer, mainly represented by SCC [52]. In autopsies, high death rates from lung cancer have been observed in both smoking and non-smoking TB patients [53]. Although the precise mechanism for the direct involvement of tuberculosis in the development of lung cancer is still not clear, it has been suggested that the chronic intense inflammatory process could stimulate cell proliferation and growth [54]. Additionally studies have shown that DNA damage caused by reactive nitrogen species contributed to the carcinogenesis process which was associated to the chronic inflammatory process [24]. It has also been established that an accumulation of DNA damage can cause carcinogenic or mutagenic alterations in cells [20,36,21]. Therefore, based on the findings of this study, we can suggest that the increase in antioxidant enzyme activity, probably to impede an excess of free radicals, associated to DNA damage, is involved in the pathogenesis of lung cancer.

In conclusion, our results indicate that pulmonary TB patients under treatment presented DNA damage in peripheral blood mononuclear cells. However, this damage was not related to nitric oxide, but due to elevated enzymatic antioxidant activity which was probably associated with other free radicals.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors thank the patients and the healthy volunteers for their acceptance to participate in this study. We also thank the Infectious and Parasitic Diseases Services at

Botucatu Medical School University Hospital – UNESP, Botucatu Teaching Health Centre, and Primary Healthcare units of Botucatu and the surrounding region.

References

1. R. Focaccia, R. Veronesi, Tratado de Infectologia 3^a ed. Vol. 2. São Paulo: Atheneu, (2005).
2. World Health Organization Publications. <http://www.who.int/en/> WHO publications on tuberculosis. Tuberculosis facts - handout 2010. Available from: <http://www.who.int/tb/en>
3. R.M. Jasmer, P. Nahid, P.C. Hopewell, Clinical practice: latent tuberculosis infection, N. Engl. J. Med. 347 (2002) 1860-1866.
4. T.C. Zahrt, Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection, Microbes. Infect. 5 (2003) 159-67.
5. N. Fujiwara, K. Kobayashi, Macrophages in inflammation, Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy. 4 (2005) 281–286.
6. D.G. Russell, Who puts the tubercle in tuberculosis? Nat. Rev. Microbiol. 5 (2007) 39–47.
7. B.M. Saunders, W.J. Britton, Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis, Immunol. Cell. Biol. 85 (2007) 103–111.
8. C.H. Ladel, G. Szalay, D. Reidel, S.H.E Kaufmann, Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages, Infect. Immun. 65 (1997) 1936–38.
9. R.A. Henderson, S.C. Watkins, J.L. Flynn, Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*, J. Immunol. 159 (1997) 635–43.
10. J. MacMicking, Q.W. Xie, C. Nathan, Nitric oxide and macrophage function, Annu. Rev. Immunol. 15 (1997) 323–350.

11. B.H. Miller, R.A. Fratti, J.F. Poschet, G.S. Timmins, S.S. Master, M. Burgos, M.A. Marletta, V. Deretic, Mycobacteria Inhibit Nitric Oxide Synthase Recruitment to Phagosomes during Macrophage Infection, *Infection and Immunity*. 72 (2004) 2872–2878.
12. C.S Yang, J.M. Yuk, E. Kyeong Jo, The Role of Nitric Oxide in Mycobacterial Infections, *Immune Network*. (2009) 46-52.
13. M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell. Biochem*. 266 (2004) 37–56.
14. B.N. Ames, Endogenous DNA damage as related to cancer and ageing, *Free Radic. Res. Commun*. 7 (1989) 121–128.
15. B. Halliwell, O. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*. 281 (1991) 9–19.
16. M. Dong, C. Wang, W.M. Deen, P.C. Dedon, Absence of 20-deoxyoxanosine and presence of abasic sites in DNA exposed to nitric oxide at controlled physiological concentrations. *Chem. Res. Toxicol*. 16 (2003) 1044–1055.
17. A. Nalbandian, B.S. Yan, A. Pichugin, R.T. Bronson, I. Kramnik, Lung carcinogenesis induced by chronic tuberculosis infection: the experimental model and genetic control, *Oncogene*. 28 (2009) 1928–1938.
18. L.R.C. Oliveira, G.A.G. Cezario, C.R.G. Lima, V.C. Nicolete, E. Peresi, M.T. Sibio, M.C.M. Picka, S.A. Calvi, DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*, *Mutation Research*. 723 (2011) 177– 181.
19. D.A. Ribeiro, S.A. Calvi, M.C.M Picka, E. Peresi, T.B. De Carvalho, P.K. Caetano, L.R. Nagoshi, C.R.G. Lima, J. Marcondes- Machado, D.M. Salvadori, DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*, *Exp. Parasitol*. 116 (2006) 296-301.

20. S. Selek, M. Aslan, M. Horoz, H. Celik, N. Cosar, F. Gunak, A. Kocyigit, Peripheral DNA Damage in Active Pulmonary Tuberculosis, *Environmental Toxicology* 2011 (2011).
21. D. D' Souza, B.C. Das, Genotoxic effects of *mycobacterium leprae* infection in humans, *Mutat. Res.* 305 (1999) 211-222.
22. V.V. Rao, E.V. Gupta, J.M, Thomas Chromosome damage in untreated tuberculosis patients, *Tubercle.* 71 (1990) 169-172.
23. K. Oka, L. Chan, Inhibition and regression of atherosclerotic lesions, *Acta Biochim. Pol.* 52 (2005) 311–319.
24. A. Nalbandian, B.S. Yan, A. Pichugin, R.T. Bronson, I. Kramnik, Lung carcinogenesis induced by chronic tuberculosis infection: the experimental model and genetic control, *Oncogene.* 28 (2009) 1928–1938.
25. A. Boyum, Separation of leukocytes from blood and bone marrow, Introduction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97 (1968) 7.
26. Y.F. Sasaki, S. Kawaguchi, A. Kamaya, M. Oshita, K. Kabasawa, I. Iwama, K. Taniguchi, S. Tsuda, The comet assay with mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutat. Res.* 519 (2002) 103-119.
27. A. Hartmann, E. Agurell, S. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 45– 51.
28. G. Beretta, G. Aldini, R.M. Facino, R.M. Russel, N.I. Krinsky, K.J. Yeum, Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability, *Anal Biochem.* 354 (2006) 290-298.
29. T. Madebo, B. Lindtjorn, P. Aukrust, R.K. Berge, Circulating antioxidants and lipid peroxidation products in untreated tuberculosis patients in Ethiopia, *Am. J. Clin. Nutr.* 78 (2003) 117–122.

30. I. Wiid, T. Seaman, E.G. Hoal, A.J. Benade, P.D. Van Helden, Total antioxidant levels are low during active TB and rise with anti-tuberculosis therapy, *IUBMB Life*. 56 (2004) 101–106.
31. S. Kwiatkowska, U. Szkudlarek, M. Luczynska, D. Nowak, M. Zieba, Elevated exhalation of hydrogen peroxide and circulating IL-18 in patients with pulmonary tuberculosis, *Respir. Med.* 101 (2007) 574–580.
32. W. Liu, X.J. Liu, Q. Yu, J. Zhao, Z.L. Lei, L. Li, A study on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in patients with tuberculous pleurisy, *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 26 (2003) 781–784.
33. J. Keane, M.K. Balcewicz-Sablinska, H.G. Remold, G.L. Chupp, B.B. Meek, M.J. Fenton, H. Kornfeld, Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immun.* 65 (1997) 298–304.
34. M.P. O’Sullivan, S. O’Leary, D.M. Kelly, J. Keane, A caspase independent pathway mediates macrophage cell death in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Infect. Immun.* 75 (2007) 1984–1993.
35. J. Kleinnijenhuis, M. Oosting, L.A.B Joosten, M.G. Netea, R. Van Crevel, Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*, *Clinical and Developmental Immunology*. 2011 (2011): 405310.
36. M. Dizdaroglu, Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry, *Methods Enzymol.* 234 (1994) 3–16.
37. S.D.J.S.S. Gross, I. Sukuma, R. Levi, C.F. Nathan, Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide, *J. Exp. Med.* 169 (1989) 1011–1020.
38. K. Suzuki, F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, M. Makino, Localization of CORO1A in the Macrophages Containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem. Cytochem.* 39 (2006) 107–112.

39. D. Gupta, S. Sharma, J. Singha, A.T. Satsangi, C. Antony, K. Natarajan, Suppression of TLR2-Induced IL-12, Reactive Oxygen Species, and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by *Mycobacterium tuberculosis* Antigens Expressed inside Macrophages during the Course of Infection, *J. Immunol.* 184 (2010) 5444-5455.
40. J. Chan, X. Fan, S.W. Hunter, P.J. Brennan, B.R. Bloom, Lipoarabinomannan, a Possible Virulence Factor Involved in Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages, *Infection and Immunity.* (1991) 1755-1761.
41. J. Pieters, *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance, *Cell Host & Microbe.* 3 (2008) 399-407.
42. Y. Yuhas, E. Berent, R. Cohen, S. Ashkenazi, Roles of NF- κ B Activation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Inhibition in the Effect of Rifampin on Inducible Nitric Oxide Synthase Transcription in Human Lung Epithelial Cells, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* (2009) 1539–1545.
43. S. Kwiatkowska, U. Szkudlarek, M. Luczynska, D. Nowak, M. Zieba, Elevated exhalation of hydrogen peroxide and circulating IL-18 in patients with pulmonary tuberculosis, *Respir. Med.* 101 (2007) 574–580.
44. E.D. Harris, Regulation of antioxidant enzymes, *FASEB J.* 6 (1992) 2675–2683.
45. Wiid, T. Seaman, E.G. Hoal, A.J.S. Benade, P.D. Van Helden, Total Antioxidant Levels are Low During Active TB and Rise with Anti-tuberculosis Therapy, *IUBMB Life.* 56 (2004) 101–106.
46. P. Jaruga, T.H. Zastawnya, J. Skokowski, T.M Dizdaroglu, R. Olinski, Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer, *FEBS Letters.* 341 (1994) 59-64.
47. A.A. Franco, R.S. Odom, T.A. Rando, Regulation of Antioxidant Enzyme Gene Expression in Response to Oxidative Stress and During Differentiation of Mouse Skeletal Muscle, *Free Radical Biology & Medicine.* 27 (1999) 1122–1132.

48. Y.S. Ho, M.S. Dey, J.D. Crapo, Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia, *Am. J. Physiol.* 270 (1996) 810–818.
49. S. Shull, N.H. Heintz, M. Periasamy, M. Manohar, Y.M. Janssen, J.P. Marsh, B.T. Mossman, Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 24398–24403.
50. L.Z.H. Zhou, A.P. Johnson, T.A. Rando, Nf- κ B and AP-1 Mediate Transcriptional Responses to Oxidative Stress in Skeletal Muscle Cells, *Free Radical Biology & Medicine.* 31 (2001) 1405–1416.
51. N.A. Dacosta, S.G. Kinare, Association of lung carcinoma and tuberculosis, *J. Postgrad. Med.* 37 (1991) 185–189.
52. T. Kurasawa, The coexistence of pulmonary tuberculosis and lung cancer. *Nippon. Rinsho.* 56 (1998) 3167–3170.
53. R. Sakurai, R. Sasaki, M. Yamaguchi, A. Shibata, K. Aoki, Prognosis of female patients with pulmonary tuberculosis, *Jpn. J. Med.* 28 (1989) 471–477.
54. W. Zheng, W.J. Blot, M.L. Liao, Z.X. Wang, L.I. Levin, J.J. Zhao, J.F. Fraumeni Jr, Y.T. Gao, Lung cancer and prior tuberculosis infection in Shanghai, *Br. J. Cancer.* 56 (1987) 501–504.

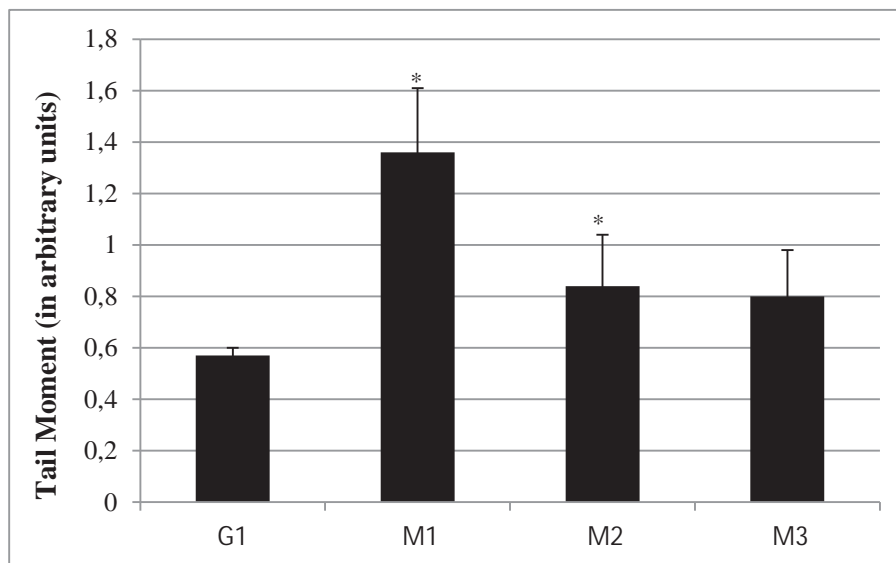


Fig 1: DNA damage in PBMCs from the control (G1) and patients (G2) group during anti-tuberculosis treatment at three moments: M1 (start of treatment); M2 (three months of treatment); and M3 (six months of treatment). Results are represented by mean \pm SEM (standard error of the mean). * $p < 0.05$ compared to G1.

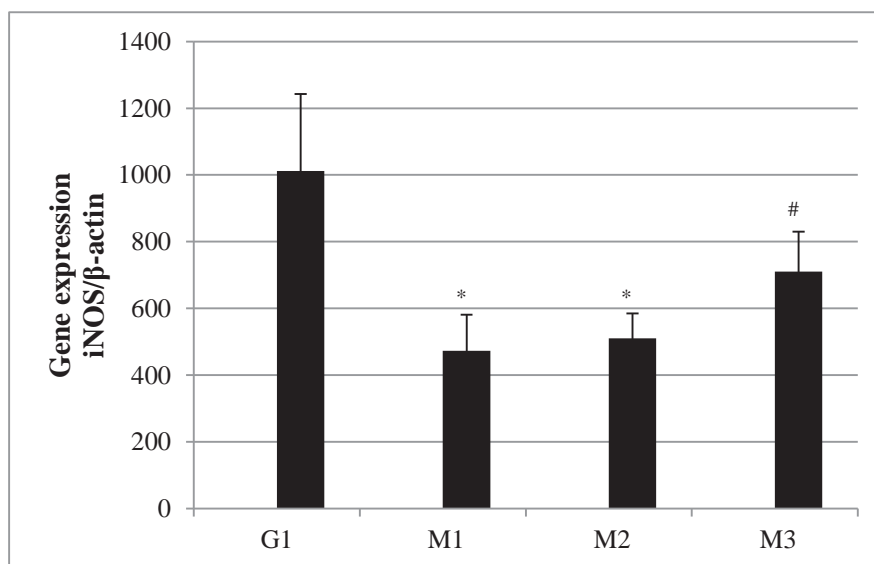


Fig 2: Gene expression of iNOS mRNA in the control (G1) and patients group (G2) during anti-tuberculosis treatment at three moments: M1 (start of treatment); M2 (three months of treatment); and M3 (six months of treatment). Results are represented by mean \pm SEM (standard error of the mean). * $p < 0.05$ compared to G2; # $p < 0.05$ compared to M1.

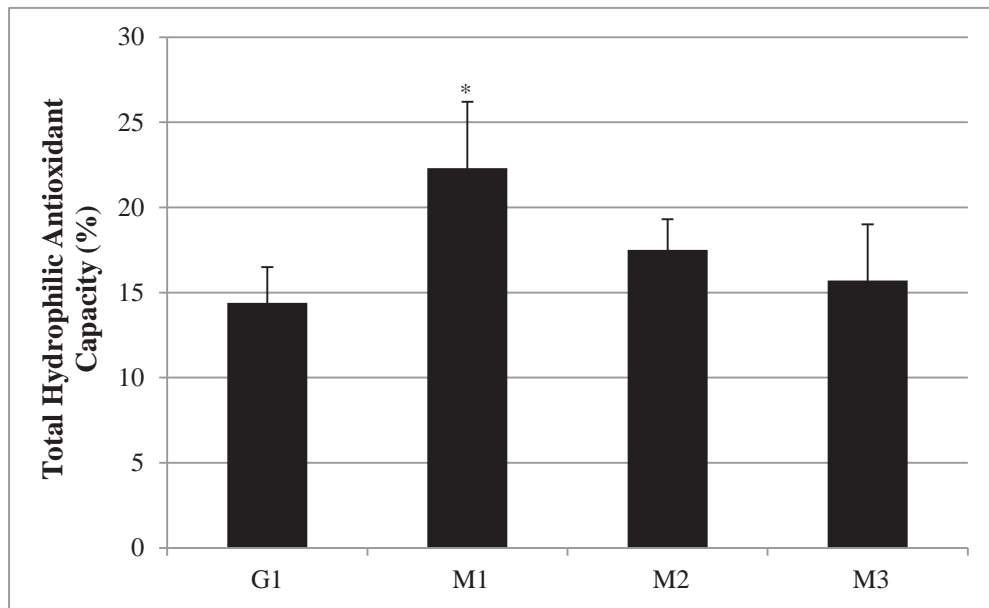


Fig 3: Total hydrophilic antioxidant capacity (THAC) in the control (G1) and patients group (G2) during anti-tuberculosis treatment at three moments: M1 (start of treatment); M2 (three months of treatment); and M3 (six months of treatment). Results are represented by mean \pm SEM (standard error of the mean). * $p < 0.05$ compared to G1.

4.3. Artigo 3: A ser submetido

EXPRESSÃO DO mRNA $Foxp3^+$ e perfil de CITOCINAS DURANTE A TERAPIA ANTITUBERCULOSE

Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira⁽¹⁾, Eliana Peresi⁽¹⁾, Marjorie de Assis Golim⁽²⁾, Mariana Gatto⁽¹⁾, Sueli Aparecida Calvi⁽¹⁾

1. Tropical Diseases Department, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, São Paulo State University, Brazil

2. Laboratório de Citometria de Fluxo, Hemocentro de Botucatu-Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, São Paulo State University, Brazil

Resumo

Aproximadamente 10% das pessoas infectadas com o *Mycobacterium tuberculosis* desenvolvem doença ativa, e a produção de citocinas Th1 apresenta importante papel no controle da infecção. As células T regulatórias (Treg) constituem um componente chave para tolerância periférica, suprimindo células autoreativas e desenvolvendo um papel crítico no controle da resposta imune nas infecções. Tem sido demonstrado que as Tregs expressando Foxp3, têm envolvimento na patogênese da infecção pelo *M. tuberculosis*, já que a expressão desse fator de transcrição, assim como as citocinas TH2 de algum modo regulam a resposta imune, entretanto pouco é conhecido sobre o efeito do tratamento nesse processo. Nosso objetivo foi avaliar o efeito da terapia antituberculose na expressão do RNAm Foxp3 e no perfil de citocinas TH1/TH2 em pacientes com tuberculose pulmonar. Foram estudadas amostras de sangue total de controles saudáveis PPD⁺ e de pacientes durante o tratamento antituberculose. Após a obtenção das células mononucleares do sangue periférico, foi realizada quantificação gênica pela qPCR. A quantificação das citocinas foi realizada pela técnica do CBA. Pacientes tratados apresentaram expressão gênica de Foxp3 maior do que os indivíduos controles durante todo o tratamento. A citocina IFN- γ , aumentou após o início do tratamento enquanto o TNF- α diminuiu. Já o TGF- β apresentou os maiores níveis durante todo o tratamento. Expressão e produção de IL-10 tendeu a aumentar durante o tratamento. Nossos resultados sugerem que mecanismos efetores e supressores atuam simultaneamente durante o tratamento da tuberculose, e o balanço entre os dois tipos de resposta é importante para controlar a destruição do *Mycobacterium* e a imunopatogênia da doença. Além disso, o tratamento contribui não somente com o clearance das micobactérias, mas também para um restabelecimento da resposta imune.

Palavras chaves: Tregs, citocinas, Th1, Th2, tuberculose, tratamento

1. Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de evolução crônica, tendo como agente etiológico, a bactéria intracelular *Mycobacterium tuberculosis* ⁽¹⁾. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) ⁽²⁾ estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo bacilo, com 9,4 milhões de casos novos e 1,7 milhões de mortes devido à doença por ano. A tuberculose é letal sem tratamento e é fundamentalmente quimioterápica, o qual diminui drasticamente a mortalidade, reduz o período de transmissibilidade e, quando usada profilaticamente, previne o adoecimento, constituindo assim a ferramenta mais importante no controle da doença ⁽¹⁾. Existem atualmente quatro antimicrobianos de primeira linha, isoniazida, etambutol, pirazinamida e rifampicina, razoavelmente efetivos no tratamento de indivíduos com tuberculose em atividade, porém, ineficientes durante o estágio latente da doença ^(3,4). De uma maneira geral, as drogas antituberculosas atuam por interferência enzimática ou bloqueio na síntese protéica.

O mecanismo de defesa inicial contra o *M. tuberculosis* envolve a fagocitose do microrganismo por macrófagos alveolares. Após este processo, ocorre produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas, que estimula células Natural Killer (NK) a produzirem IFN- γ . IL-12 impulsiona desenvolvimento de uma resposta Th1 para produção de mais IFN- γ ^(5,6). O IFN- γ é responsável pela ativação do macrófago para produzir TNF- α , que em sinergismo com o IFN- γ , atua aumentando o processo de fagocitose e atividade microbicida desta célula, através da produção dos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio, envolvidos na inibição do crescimento e morte da micobactéria ^(7,8,9,10). Além disso, o TNF- α é essencial para a formação e manutenção do granuloma ^(11,12,7). Estudos têm sugerido que a imunidade protetora ao *M. tuberculosis* requer além das células Th1, das células Th17, principalmente no início da infecção ⁽¹³⁾. Estas células apresentam importantes funções pró-inflamatórias, e são definidas pela produção das citocinas IL-17A a IL-17F ^(14,15). Entretanto, apesar do efeito protetor da resposta Th1 e Th17 contra a tuberculose, a elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias está relacionada com a imunopatogênica da doença ^(16,17). Para limitar esta ação deletéria, surgem os mecanismos antiinflamatórios, representados pelos receptores solúveis de TNF- α , que impedem a ligação dessa citocina ao seu receptor, por bloqueio da sinalização, pelas células T regulatórias e pelas citocinas antiinflamatórias, IL-4, IL-10 e TGF- β ^(17,18,19).

As células T regulatórias (Treg) constituem um componente chave para tolerância periférica, suprimindo células autoreativas e desenvolvendo um papel crítico no controle da

resposta imune nas infecções. As Tregs podem se desenvolver intratimicamente, de precursores CD4⁺ simples^(20,21), que desenvolvem a função de células da linhagem Treg antes de sair para a periferia e podem também ser geradas extratimicamente de células T CD4⁺ CD25⁻ naïve, nas quais a expressão de Foxp3 é induzida na dependência de TGF-β⁽²²⁾. As Treg expressam o marcador de superfície CD25⁺, e o fator nuclear de transcrição Forkhead box P3 (FoxP3), o qual parece ser fundamental para o desenvolvimento e função desta capacidade supressora, sendo o marcador molecular mais específico⁽²³⁻²⁵⁾. Estas células inibem a proliferação e/ou a produção de citocinas por outras células e esta capacidade supressora requer o contato célula-célula e/ou produção de citocinas inibitórias, tais como, IL-10 ou TGF-β. Dessa forma, os mecanismos de supressão da resposta imune descrito contra o *M. tuberculosis* incluem aumento da atividade destas células^(26,27). As Tregs são recrutados para órgãos infectados e nestes diminui a resposta imune contra a infecção pelo Mtb, prevenindo o *clearance* da micobactéria, suprimindo as células T CD4⁺ antígeno-específico e interferindo com as células apresentadoras de antígenos^(28,29,30). Assim Tregs têm a capacidade de controlar o dano tecidual, enquanto interfere no controle adequado da replicação dos bacilos⁽³¹⁾, permitindo a persistência e o estabelecimento de uma infecção crônica, porém podem também estar envolvidas na reativação da infecção e disseminação do Mtb. Estudos demonstram aumento na expressão do mRNA Foxp3 e aumento na proporção de células T CD4⁺ CD25⁺ high em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com TB do que em controles saudáveis⁽³²⁾. Além disso, tem sido demonstrado aumento na proporção de células T CD4⁺ CD25⁺ high e níveis aumentados na expressão de mRNA Foxp3 de indivíduos com TB ativa quando comparado a indivíduos com TB latente ou em controles⁽³³⁾.

Pouco é conhecido sobre o balanço entre as células Tregs expressando Foxp3 e citocinas Th1/Th2 durante o tratamento antituberculose. Desta forma, estudos avaliando a expressão do fator de transcrição Foxp3 e citocinas Th1/Th2 em pacientes durante a terapia antituberculose, poderiam contribuir para o melhor entendimento da relação parasita/hospedeiro nesta doença. Este estudo avaliou o efeito do tratamento na expressão do RNAm do Foxp3, a expressão e produção de IFN-γ, TNF-α, IL-10 and TGF-β em pacientes com tuberculose pulmonar

2. Casuística e Métodos

2.1. Casuística

Foram recrutados pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Centro de Saúde Escola de Botucatu, Unidades Básicas de Saúde de Botucatu e região e indivíduos saudáveis, profissionais da área da saúde do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os pacientes com tuberculose foram diagnosticados utilizando a informações sobre o contato com TB, história médica e sintomas clínicos (tosse, hemoptise, dor torácica, febre, perda de peso), presença de bacilos álcool-ácido resistentes pela baciloscopia e aqueles que tinham sintomas característica de TB pulmonar em raio X do tórax. Foram excluídos do estudo pacientes com TB extra-pulmonar, indivíduos HIV-positivos ou com outras imunodeficiências, pacientes com outras doenças granulomatosas, doenças auto-imune, cancer e mulheres grávidas. Os controles foram adultos saudáveis sem queixas clínicas de tuberculose pulmonar, profissionais da área de saúde do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, com PPD⁺. O teste do PPD consiste na injeção intradérmica de 0,1 ml (2U) do derivado de proteína purificado. Enduração ≥ 5 mm, medido após 72 hs foi considerado positivo. No total, foram estudados 20 controles (G1) e 19 pacientes com TB pulmonar (G2). Neste grupo as variáveis foram determinadas em três momentos: **M1**- pacientes com até um mês de tratamento antituberculose; **M2**- no terceiro mês de tratamento; **M3**- ao final dos seis meses de tratamento. O termo de consentimento livre e esclarecido assinado foi obtido de todos indivíduos estudados. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP. O tratamento dos pacientes foi realizado durante seis meses, utilizando-se o esquema padrão RIPE (isoniazida, etambutol, pirazinamida e rifampicina).

2.2. Coleta de sangue

Foram colhidas amostras de 20 ml sangue da veia do antebraço, em um único momento no grupo controle, e nos três momentos no grupo de doentes com tuberculose pulmonar. As amostras do sangue foram coletadas em tubos heparinizados e inicialmente foram centrifugadas a 1500 x g por 10 min para obtenção do plasma, para realização das

dosagens das citocinas pelo CBA. As amostras remaining de sangue foram utilizadas para obtenção das células mononucleares do sangue periférico para posterior avaliação da expressão de Foxp3, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β .

2.3. Obtenção de células mononucleares totais do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por meio da separação em gradiente de Histopaque^R (34). O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado com PBS 15 minutos a 1500 rpm. Após este período, a suspensão celular foi ressuspensa em PBS, sendo a identificação e viabilidade das mesmas realizadas pela contagem com Turk. A seguir, foi acertada a concentração da suspensão celular para 1×10^6 /ml ou 2×10^6 /ml, de acordo com o protocolo a ser utilizado.

2.4. Total RNA isolation and real-time PCR

O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico, (obtidas segundo o item 2.3), 2×10^6 céls/ml nos diferentes momentos (M1 to M3) by the TRIZOL method (GibcoBRL, São Paulo, Brazil). RNA concentration was determined by the absorbance of 260nm, and all the samples showed an absorbance value of approximately 2.0. One microgram of RNA was used for the synthesis of 20 μ L of complementary DNA (cDNA) by SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, São Paulo, Brazil). Foxp3, IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β mRNA levels were determined by real-time PCR. As sequencias dos primers está representada na tabela 1. O gene da β -Actin was used as internal control. Quantitative measurement was performed using the SYBR Green qPCR kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions on a ABI Prims 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems). The real-time cycler conditions were as follows: 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de anelamento, a 95°C por 15 segundos e extensão a 60° por 1 minuto, sendo os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60°C por 1 minuto). Product purity was confirmed by dissociation curve analysis. Gene expression was quantified relative to the values of the control group after adjusting for β -Actin. Samples from at each moment (M1-M3), from each one of the two groups (G1 and G2) were analyzed in duplicate. The results were presented as increase or decrease in gene expression.

2.5. *Quantificação da citocinas plasmáticas pelo CBA*

As dosagens das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β foram realizadas pela técnica do CBA, e analisadas citômetro de fluxo modelo FACS CALIBUR™ (Becton Dickinson) usando o programa “Cell Quest” (Becton Dickinson) de acordo com as indicações do fabricante.

2.6. *Análise Estatística*

Para comparar a expressão gênica do Foxp3, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β pela qPCR e quantificação das citocinas plasmáticas pelo CBA no tempo, foi ajustado um modelo em medidas repetidas no tempo, utilizando o proc mixed do programa SAS. Para comparar a expressão gênica do Foxp3, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β pela qPCR e quantificação das citocinas plasmáticas pelo CBA com o grupo controle foi ajustado um modelo linear generalizado de acordo com a distribuição gamma. O ajuste foi feito utilizando o proc genmod do programa SAS for windows versão 9.2. Considerou-se $p < 0,05$ como nível de significância.

3. Resultados

3.1. *Aumento da expressão gênica de Foxp3 em indivíduos com TB pulmonar durante o tratamento*

A expressão gênica do Foxp3+ em indivíduos controles (G1) e em pacientes (G2) durante o tratamento antituberculose (M1-M3) está representada na Figura 1. Quando analisamos o tratamento antituberculose, podemos observar que houve uma maior expressão gênica em M2 nos pacientes com tuberculose pulmonar. Em relação à comparação entre G1 e G2, os resultados mostraram que no início do tratamento (M1), houve um aumento da expressão deste fator de transcrição nos pacientes com tuberculose pulmonar G2 ($p=0,0047$), em relação ao grupo controle (G1). No terceiro mês de tratamento (M2), a expressão gênica deste fator continuou aumentando significativamente maior em relação ao G1 ($p=0,0036$). No fim do tratamento (M3), ocorreu uma pequena queda desta expressão em G2, apresentando ainda diferença significativa ($p=0,0002$) em relação ao G1.

3.2. Efeito da terapia antituberculose na produção e expressão de citocinas em pacientes com TB pulmonar

Em relação a expressão gênica e a produção do IFN- γ , o tratamento induziu uma expressão gênica maior em M1 ($p=0,0003$), M2 ($p<0,0001$) e M3 ($p=0,001$), quando comparado aos valores detectados nos indivíduos controles. Não foram detectadas diferenças significativas na expressão do RNAm para o IFN- γ durante o tratamento. Quanto a produção desta citocina, esta foi significativamente maior em M2 em relação a M1 ($p=0,02$), e maior em M1 ($p=0,002$) e M2 ($p=0,01$) em pacientes com tuberculose em relação aos indivíduos controles, tanto a expressão como a produção desta citocina tenderam a diminuir em M3 (Figura 2A e B). A análise da expressão gênica e produção do TNF- α (Figura 2C e D), mostrou que houve um aumento significativo na expressão gênica em M1 ($p=0,008$) e M2 ($p=0,009$) e na produção em M1 ($p=0,04$) nos pacientes com tuberculose pulmonar (G2), em relação ao grupo controle (G1). Não foram detectadas diferenças estatísticas na expressão gênica do TNF- α entre os diferentes momentos do tratamento. A produção do TNF foi menor em M3 ($p=0,01$) em relação ao M1.

A expressão gênica da IL-10 em pacientes foi significativamente maior em M1 ($p=0,02$) e M3 ($p=0,01$) em relação ao grupo controle, não apresentando diferenças significativas durante o tratamento. A produção da IL-10 foi menor em pacientes em M1 e aumentou em M2 e M3, porém sem diferenças significativas (Figura 3A e B). A análise da expressão gênica e produção do TGF- β (Figura 3C e D), mostrou no grupo de pacientes com tuberculose pulmonar (G2) a expressão gênica foi significativamente maior em M2 ($p=0,006$) em relação ao grupo controle (G1). A produção do TGF- β foi maior em M1 ($p<0,0001$), M2 ($p=0,001$) e M3 ($p=0,01$) em relação ao controle, porém sem diferença durante o tratamento (Figura 3C e D).

4. Discussão

O balanço entre os mecanismos de resposta imune efetores e supressores pode ser o papel chave para o controle do desenvolvimento da infecção causada pelo *M. tuberculosis*. As células T regulatórias têm sido associadas com a regulação de funções imunológicas em algumas doenças como as autoimunes, as causadas por tumores^(35,36), e as infecciosas^(37,38). Estas células podem regular células efetoras durante a longa persistência da doença, impedindo um dano tecidual causado por estas células^(39,40). Entretanto, durante uma infecção

crônica, como a causada pelo *M. tuberculosis*, as células Tregs podem também ser prejudiciais, porque podem regular as células T antígeno específico, desativando macrófagos e, portanto, inibindo o controle da replicação da bactéria ⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾. Na tuberculose o papel das Tregs não é bem entendido, uma vez que não está claro se sua expansão seja causadora ou uma consequência da doença. Essas células podem limitar a reação inflamatória e o dano tecidual, induzido durante a reação imunológica contra as micobactérias. É possível que a expansão dessas células ocorra em resposta a infecção pelo *M. tuberculosis*, ao reconhecer produtos bacterianos particulares, ou através da indução de IL-10 e TGF- β , produzidos durante a infecção. Neste estudo, observamos uma maior expressão gênica do Foxp3 durante todo o tratamento, quando comparado aos indivíduos controles. Estes resultados estão de acordo com estudos conduzidos por Marin *et al.* ⁽⁴⁵⁾, que mostraram um aumento da frequência de células T CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ em pacientes com tuberculose ativa, comparado com indivíduos latencialmente infectados com o *M. tuberculosis*. Além disso, aumento dessas células tanto no sangue periférico, como no infiltrado pleural, de pacientes com tuberculose pleural, tem sido observado, indicando que estas células são capazes de se expandir tanto no sangue periférico como no sítio da infecção. Guyot-Revol *et al.* ⁽⁴⁶⁾, encontraram aumento da expressão do mRNA de Foxp3 em pacientes com tuberculose ativa, quando comparado com controles não infectados. Baseados nestes achados, foi sugerido que esta elevação foi devido ao aumento da frequência de células Treg. Além disso, em um estudo utilizando uma dupla marcação para CD25+ e Foxp3 demonstrou um aumento da frequência de células Treg expressando Foxp3, no sangue periférico de pacientes com Tb ativa ^(46,47).

O IFN- γ apresenta papel fundamental no desenvolvimento de resposta protetora na tuberculose ⁽⁴⁸⁾. Tem sido demonstrado que indivíduos com genes defeituosos para produção de IFN- γ ou no receptor desta citocina estão propensos a sérias infecções micobacterianas, incluindo com o *M. tuberculosis* ⁽⁴⁹⁾. Entretanto, no presente estudo, os pacientes apresentaram níveis significativamente aumentados da expressão do mRNA para o IFN- γ no início do tratamento, enquanto os níveis plasmáticos aumentaram após o terceiro mês de tratamento, em relação aos indivíduos controles. Pacientes recém diagnosticados apresentavam maiores níveis IFN- γ , no soro, quando comparados a indivíduos com história prévia de tuberculose, e estes indivíduos apresentavam níveis desta citocina semelhantes aos controles saudáveis. No entanto, quando se avaliou o tratamento foi verificado que indivíduos não tratados apresentavam níveis mais elevados desta citocina, que durante o tratamento diminuíram gradativamente ⁽⁵⁰⁾. Entretanto, esses resultados não estão de acordo com os nossos e outros

que mostraram a produção do IFN- γ aumentou durante o curso da terapia ⁽⁵¹⁾. A provável explicação para o aumento desta citocina após o tratamento é baseada em alguns estudos que verificaram que no momento do diagnóstico da tuberculose, a concentração de IFN- γ é mais elevada no sítio de infecção do que no sangue periférico, sugerindo que durante a atividade da tuberculose, há uma compartimentalização dos linfócitos específicos contra o antígeno micobacteriano no local da infecção, e que o aumento das concentrações de IFN- γ no soro, no período quimioterápico, coincidem com a chegada de linfócitos ao sangue periférico ⁽⁵²⁾. De forma contrária ao que detectamos em nosso estudo, outros observaram que os níveis de IFN- γ estavam deprimidos em doentes com tuberculose ativa ^(53,54). Pacientes apresentando a forma moderada de TB apresentaram níveis de IFN- γ maiores, do que os que possuem a forma mais grave ⁽⁵¹⁾. Desta forma, diante destes estudos podemos sugerir levando-se em conta que os níveis de IFN- γ em pacientes sem tratamento foram semelhantes aos detectados nos indivíduos controles, e que o tratamento aumentou significativamente estes níveis, que nossos pacientes apresentam uma forma mais moderada da doença, uma vez que a maioria dos indivíduos foi recrutada de ambulatórios, e não se encontrava internada. Embora, nossos resultados mostraram que a expressão desta citocina foi elevada no início do tratamento, não se traduziu em produção, que apresentou apenas uma tendência em ser maior que a dos indivíduos controles. Nesta fase do tratamento, esses níveis não foram relacionados com proteção, provavelmente porque ainda não estavam em quantidades adequadas para ativar os mecanismos responsáveis pela destruição da micobactéria. No decorrer do tratamento os níveis do IFN- γ aumentaram, e provavelmente foram suficientes para ativar a resposta protetora.

O TNF- α , uma importante citocina para controle da infecção, envolvida no processo de ativação de macrófagos, mas também é um importante fator relacionado com a imunopatogenia da doença ⁽⁵⁵⁾. No presente estudo, os pacientes com tuberculose apresentaram níveis de TNF- α significativamente mais elevados do que os controles. Durante o tratamento dos doentes, a produção e a expressão gênica desta citocina foram diminuindo gradativamente. De acordo com nossos resultados, outros também demonstraram que indivíduos com tuberculose pulmonar apresentaram níveis elevados de TNF- α , em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico, quando comparados aos controles, que diminuíram ao longo do tratamento ^(55,50). Entretanto, este estudo mostra que apesar do TNF- α apresentar níveis elevados, em pacientes no início do tratamento, podemos sugerir que nesta fase não foi protetor, e provavelmente estaria envolvido com a

patogênese da doença, e com o tratamento, esses níveis tornaram-se mais baixos e poderiam estar relacionados com proteção, envolvidos nos mecanismos de destruição do parasita. O TNF- α , dependendo da concentração em que é produzido, pode estar envolvido nos efeitos imunopatológicos, tais como febre, diminuição do peso corporal, necrose tecidual e choque ⁽⁵⁶⁻⁶³⁾. Neste sentido, em pacientes africanos com tuberculose o baixo peso corporal foi associado com aumento dos níveis das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β ⁽⁶⁴⁾.

Alguns estudos têm mostrado que pacientes com tuberculose pulmonar recém diagnosticada apresentam níveis séricos de IL-10 maiores, do que os indivíduos tratados previamente e os saudáveis, entretanto, a terapia diminuiu as concentrações séricas desta citocina ^(65,50). Resultados que discordam com os nossos em relação a expressão e produção da IL-10, uma vez que a expressão foi maior no início e no fim do tratamento. De forma semelhante ocorreu com a produção, já que os níveis tenderam a aumentar durante o tratamento. Estas diferenças entre a expressão e a produção podem ser explicadas pela estabilidade do mRNA e pela taxa transcricional e fatores de regulação traducionais, que podem afetar diretamente a expressão e produção de mediadores envolvidos com a resposta imune ⁽⁶⁶⁾. Por outro lado, outros estudos observaram que antes do tratamento antituberculose, pacientes com tuberculose pulmonar apresentam níveis séricos semelhantes desta citocina em relação ao controle, resultados que concordam com os deste estudo no início do tratamento ⁽⁶⁷⁾. Em nosso estudo, apesar da elevada expressão, a produção da IL-10 foi baixa, em pacientes no início do tratamento, sugerindo que sua principal atuação foi no final do tratamento, exercendo um papel regulatório para controlar o processo inflamatório.

Na tuberculose, o TGF- β pode primeiramente exercer um papel supressor do perfil Th1, e participar na indução da fibrose ⁽⁵⁵⁾. Em baixas concentrações, ainda atua como fator quimiotático para monócitos, induzindo a secreção de IL-1 α e TNF- α , além de participar na diferenciação de células Th17 junto com IL-6 e IL-21 ⁽⁶⁸⁾, e na de células Treg ⁽⁶⁹⁾. No presente estudo a expressão gênica do TGF- β tendeu a aumentar principalmente no terceiro mês de tratamento, quando comparada aos controles. O tratamento também aumentou a expressão desta citocina, principalmente neste período, que tendeu a cair no final do tratamento. Além disso, os níveis plasmáticos desta citocina foram maiores em pacientes com TB pulmonar do que em indivíduos controles em todos os momentos do tratamento. De forma semelhante ao obtido neste estudo outros detectaram níveis elevados desta citocina, em sobrenadante de cultura de células obtidos de pacientes com tuberculose pulmonar, que diminuíram no final do tratamento ⁽⁵⁵⁾. Altos níveis de TGF- β , também foram encontrados no plasma e no fluido pleural de pacientes com TB antes da cura, em relação a contactantes

saudáveis, ocorrendo uma queda na concentração desta citocina após a cura ⁽⁶⁷⁾. Diante do que foi apresentado, nossos resultados estão de acordo com a literatura, que relatam que pacientes com TB pulmonar não apresentam deficiência na produção de TGF- β , na doença em atividade e durante o tratamento antituberculose. Podemos sugerir que os altos níveis desta citocina em pacientes, no início do tratamento, estejam atuando suprimindo a resposta imune protetora, e no decorrer do tratamento, poderiam estar regulando a atividade inflamatória, contribuindo para proteção contra danos causados pela resposta inflamatória exacerbada, além de atuar nos processos de deposição de matriz extracelular e de fibrose.

Em resumo, no início do tratamento foi detectada baixa produção de citocinas de perfil Th1 como IFN- γ , altos níveis de TNF- α que não foi protetor, alta expressão de Foxp3 e principalmente de TGF- β que provavelmente estariam atuando inibindo os mecanismos protetores e excesso de inflamação, enquanto que ao longo do tratamento ocorreu aumento dos níveis de IFN- γ , e queda de TNF- α , e nesta fase provavelmente os elevados níveis do Foxp3 e do TGF- β estariam relacionados com diminuição do processo inflamatório. Nossos resultados sugerem que mecanismos efetores e supressores atuam simultaneamente durante o tratamento da tuberculose, e o balanço entre os dois tipos de resposta é importante para controlar a destruição do *Mycobacterium* e a imunopatogênica da doença. Além disso, o tratamento contribui não somente com o *clearance* das micobactérias, mas também para um restabelecimento da resposta imune.

Referencias Bibliográficas

1. Focaccia R, Veronesi R. Tratado de Infectologia. 3^a ed. Vol. 2. São Paulo: Atheneu, 2005.
2. World Health Organization Publications. <http://www.who.int/en/> WHO publications on tuberculosis. Tuberculosis facts – handout 2010. Available from: <http://www.who.int/tb/en>
3. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice: latent tuberculosis infection. N Engl J Med. 2002; 347: 1860-1866.
4. Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Microbes Infect. 2003; 5: 159-67.

5. Ladel CH, Szalay G, Reidel D, Kaufmann SHE.. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Infect. Immun.* 1997; 65: 1936–38.
6. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 1997; 159: 635–43.
7. Denis M, Gregg EO, Ghandirian E. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* 1990; 12: 721-7.
8. Eun-Kyeong J, Jeong-Kyu P, Hazel MD. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003; 16: 205-10.
9. Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* 1999; 103:1023–29.
10. Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM, Kornfeld H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1997; 65:5149–56.
11. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 679-91.
12. Kaufmann SHE. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum.* 2002; 61: 1154-58.
13. Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, Isaacs F, Hofmeister J, Black G, Hassan HY, Wilkinson RJ, Walzl G, Gelderbloem SJ, Mahomed H, Hussey GD, Hanekom WA. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4₊ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J. Immunol.* 2008; 180: 1962–1970.
14. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995; 3: 811–21.

15. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, et al. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 2009; 31: 799–810.
16. Van Crevel R, Ottenhoff TH, Van Der Meer JW. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 294-309.
17. Lasco TM, Cassone L, Kamohara H, Yoshimura T, McMurray DN. Evaluating the role of tumour necrosis factor-alpha in experimental pulmonary tuberculosis in the guinea pig. *Tuberculosis.* 2005; 85: 254-8.
18. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavolon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation between the Kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1996; 89: 26-33.
19. Juffermans NP, Verbon A, Van Deventer SJH, Buurman WA, Van Deutekon H, Speelman P, et al. Tumour necrosis factor and interleukin-1 inhibitors as markers of disease activity of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 1328-31.
20. Liston A, Nutsch KM, Far AG, Lund JM, Rasmussen JP, Soni PA, et al. Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 11903–8.
21. Lee HM, Hsieh CS. Rare development of Foxp3+ thymocytes in the CD4+CD8+ subset. *J Immunol.* 2009; 183: 2261–6.
22. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N. Conversion of peripheral CD4+CD25– naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003; 198: 1875–86.
23. Oberg HH, Juricke M, Kabelitz D, Wesch D. Regulation of T cell activation by TLR ligands. *European Journal of Cell Biology.* 2011; 90: 582–592.

24. Chen X, Zhou B, Li M, Denga Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clinical Immunology*. 2007; 123: 50–59.
25. He XY, Xiao L, Chen HB, Hao J, Li J, Wang YJ, He K, Gao Y, Shi BY. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 6: 643-650.
26. Ribeiro-Rodrigues R, Resende CT, Rojas R, Toossi Z, Dietze R, Boom WH, et al. A role for CD4⁺CD25⁺ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2006;144: 25-34.
- 27 Babu S, Bhat S, Kumar N, Kumaraswami V, Nutman T. Regulatory T cells Modulate Th17 responses in patients with positive Tuberculin Skin test results. *J Infect Dis*. 2010; 201: 20-31.
28. Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med*. 2007; 204: 2159-69.
29. Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, et al. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol*. 2007;123: 50-9.
30. Garg A, Barnes PF, Roy S, Quiroga MFN, Wu S, Garcia VE, et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol*. 2008; 38: 459-69.
31. Kursar M, Koch M, Mittrucker HW, Nouailles G, Bonhagen K, Kamradt T, et al. Cutting edge: regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*. 2007; 178: 2661-5.

32. Flesch I, Kaufmann SHE. Mycobacterial growth inhibition by interferons activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1987; 138: 4408-13.
33. Serbina N, Lazarevic V, Flynn JL. CD4 β T cells are required for the development of cytotoxic CD8 β T cell during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2001; 167: 6991-7000.
34. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968; 97:7.
35. Sakaguchi S. Naturally arising CD4 β regulatory T cells for Immunologic selftolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol*. 2004; 22: 531.
36. Piersma SJ, Welters MJP, van der Burg SH. Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients. *Hum Immunol*. 2008; 69: 24.
37. Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev*. 2006; 212: 272.
38. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 875.
39. Chatenoud L, Salomon B, Bluestone JA. Suppressor T cellsethey're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev*. 2001; 182: 149.
40. Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus host disease. *Blood*. 2007; 110: 3804.
41. Kursar M, Koch M, Mittrucker HW, Nouailles G, Bonhagen K, Kamradt T, et al. Cutting edge: regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2007; 178: 2661-5.

42. Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, et al. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. Clin Immunol. 2007; 123: 50-9.
43. Garg A, Barnes PF, Roy S, Quiroga MFN, Wu S, Garcia VE, et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. Eur J Immunol. 2008; 38: 459-69.
44. Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, et al. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Hum Immunol. 2005; 66: 222-30.
45. Marin ND, París SC, Vélez VM, Rojas CA, Rojas M, García LF. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis. Tuberculosis. 2010; 90: 252-261.
46. Guyot-Revol V. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006; 173: 803–810.
47. Gazzola L, Tincati C, Gori A, Saresella M, Marventano I, Zanini F. FoxP3 mRNA expression in regulatory T cells from patients with tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2006; 174: 356.
48. Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. Cell Host Microbe 2008; 3(6): 399-407.
49. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacillie Calmette-Guerin infection. N Engl J Med 1996; 335: 1956-61.
50. Deveci F, Akbulut HH, Trugut T, Muz MH. Changes in serum cytokine levels in active tuberculosis with treatment. Mediators Inflamm. 2005;5: 256-62.

51. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun*. 2007;75(2):820-9.
52. Jo EK, Park JK, Dockrel HM. Dynamics of cytokine in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2003; 16: 205-10.
53. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent TH2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun*. 1996; 64: 1351-56.
54. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*. 1995; 63:3231-34.
55. Peresi E, Silva SMUR, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2008; 34: 942-949.
56. Moreno C, Taverne J, Mehlert A, et al. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 240-5
57. Aung H, Toossi Z, Wisnieski JJ, et al. Induction of monocyte expression of tumor necrosis factor alpha by the 30-kD alpha antigen of *Mycobacterium tuberculosis* and synergism with fibronectin. *J Clin Invest*. 1996; 98:1261-8.
58. Youmans GP. Mechanisms of immunity in tuberculosis. *Pathobiol Annu*. 1979; 9: 137-62.
59. Koch R. Weitere Mittheilungen u'ber ein Heilmittel gegen Tuberculose. *Dtsch Med Wochenschr*. 1890; 16: 1029.

60. Karnofsky DA, Burchenal JH. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: MacLeod CM, ed. Evaluation of agents. Proceedings of Symposium at the New York Academy of Medicine. New York: Columbia University Press. 1949; 191–205.
61. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Pignet PF, Vassalli P. The inducing role of tumour necrosis factor in the development of bactericidal during BCG infection. *Cell*. 1989; 56: 731–40.
62. Bermudez LEM, Young LS. Tumour necrosis factor alone or in combination with IL-2, but not IFN- γ , is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J Immunol*. 1988; 140: 3006-13.
63. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumour necrosis factor. *N. Engl J Med*. 1987; 316: 379–85.
64. Lawn SD, Obeng J, W. Acheampong J, Griffin GE. Resolution of the acute-phase response in West African patients receiving treatment for pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung DIS*. 2000; 4(4): 340–344.
65. Verbon A, Juffermans N, Van Deventer SJ, Speelman P, Van Deutekom H, Van Der Poll T. Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin Exp Immunol*. 1999; 115(1):110-3.
66. Chang JS, Huggett JF, Dheda K, Kim LU, Zumla A, Rook GAW. *Mycobacterium tuberculosis* Induces Selective Up-Regulation of TLRs in the Mononuclear Leukocytes of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *J Immunol*. 2006; 176: 3010-3018.
67. Olobo JO, Geletu M, Demissie A, Eguale T, Hiwot K, Aderaye G, et al. Circulating TNF- α , TGF- β , and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scand J Immunol*. 2001; 53(1): 85-91.
68. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010; 21: 455–462.

69. Maruyama T, Konkel JE, Zamarron BF, Chen W. The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin Immunol*. 2011.

Tabela1. Primers para citocinas, Beta- actina e Foxp3

Gene	Sequência Reverse	Sequência Forward	Gene Bank	Tamanho produto
IFN-γ	GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA	AGCTCTGCATCGTTTTGGGTT	NM_000619.2	118
TNF-α	GATGATCTGACTGCCTGGGC	CACGCTCTTCTGCCTGCTG	NM_000594.2	105
IL-10	TCATCTCAGAACAAGGCTTGGC	CGAGATGCCTTCAGCAGAGTG	NM_000572.2	128
TGF-β	TCCAGGCTCCAAATGTAGG	GGACACCAACTATTGCTTCAG	NM_000660.4	150
Foxp3+	ACAGTCTCTGGAGCAGCAGC	CCACAGATGAAGCCTTGGTC	NM_014009.3	101
β-actina	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	NM_001101.3	140

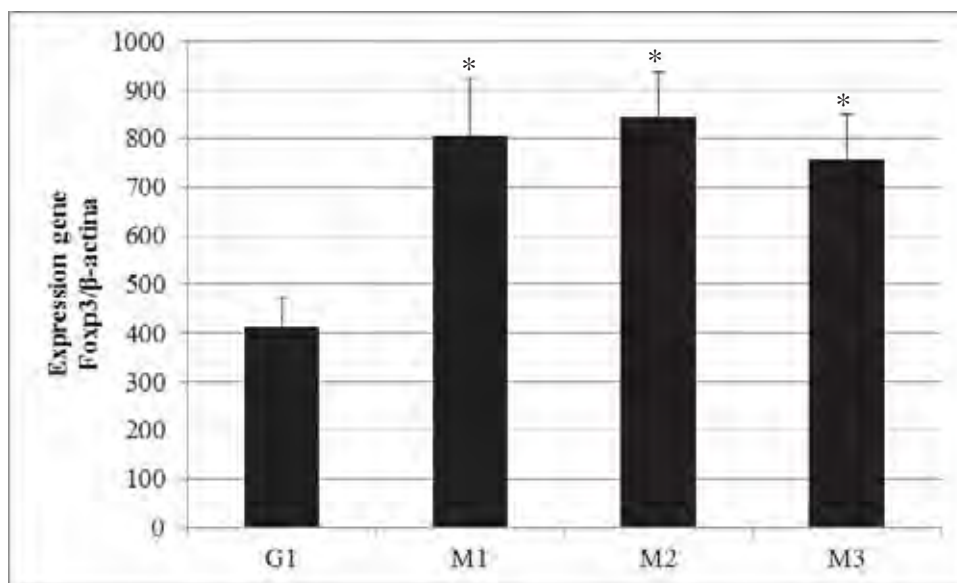


Figura 1: Expressão gênica do mRNA do Fxp3 no grupo controle (G1) e no grupo de pacientes durante o tratamento antituberculose (G2) nos três momentos: M1 (até 1 mês de tratamento); M2 (três meses de tratamento) e M3 (seis meses de tratamento). Os resultados estão representados pela média \pm S.E.M (erro padrão da média). * $p < 0,05$ quando comparados ao G1.

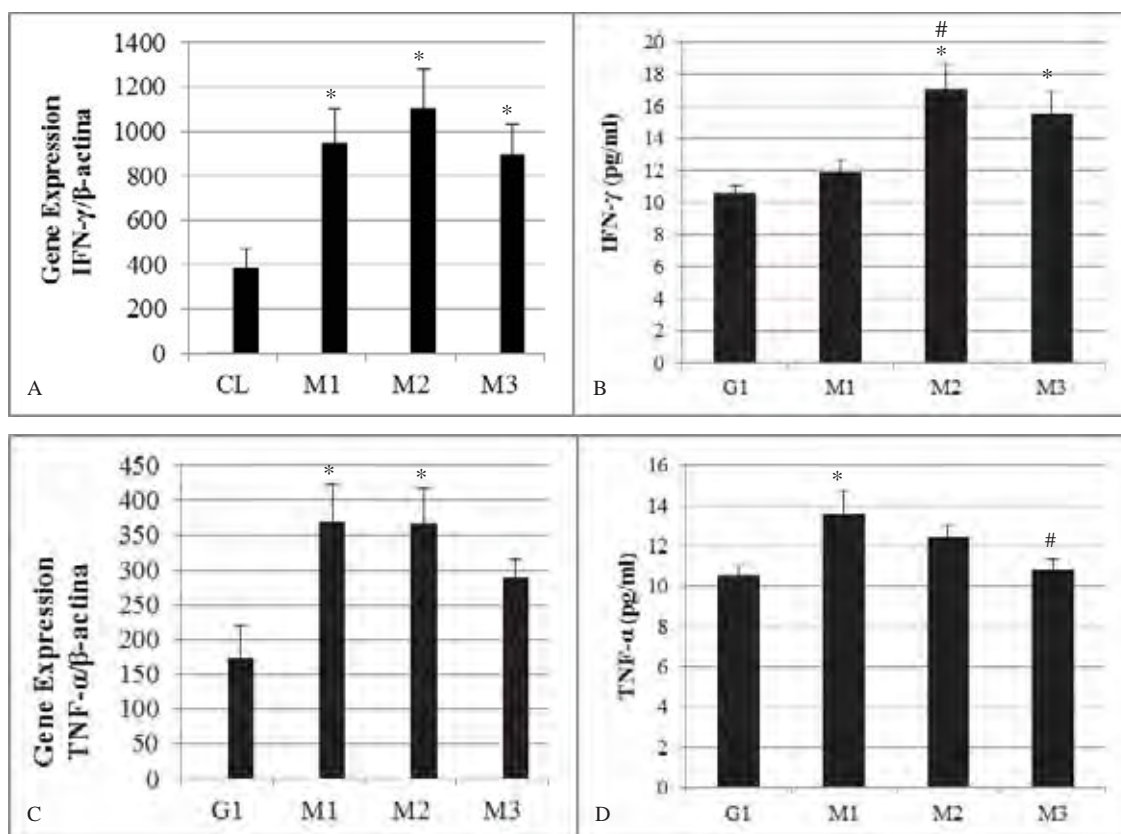


Figura 2A, B, C, D: Expressão gênica do mRNA e produção de IFN- γ (A,B) e TNF- α (C,D) no grupo controle (G1) e no grupo de pacientes durante o tratamento antituberculose (G2) nos três momentos: M1 (até 1 mês do tratamento); M2 (três meses de tratamento) e M3 (seis meses de tratamento). Os resultados estão representados pela média \pm S.E.M (erro padrão da média). * $p < 0,05$ quando comparados ao G1; # $p < 0,05$ quando comparado ao M1;

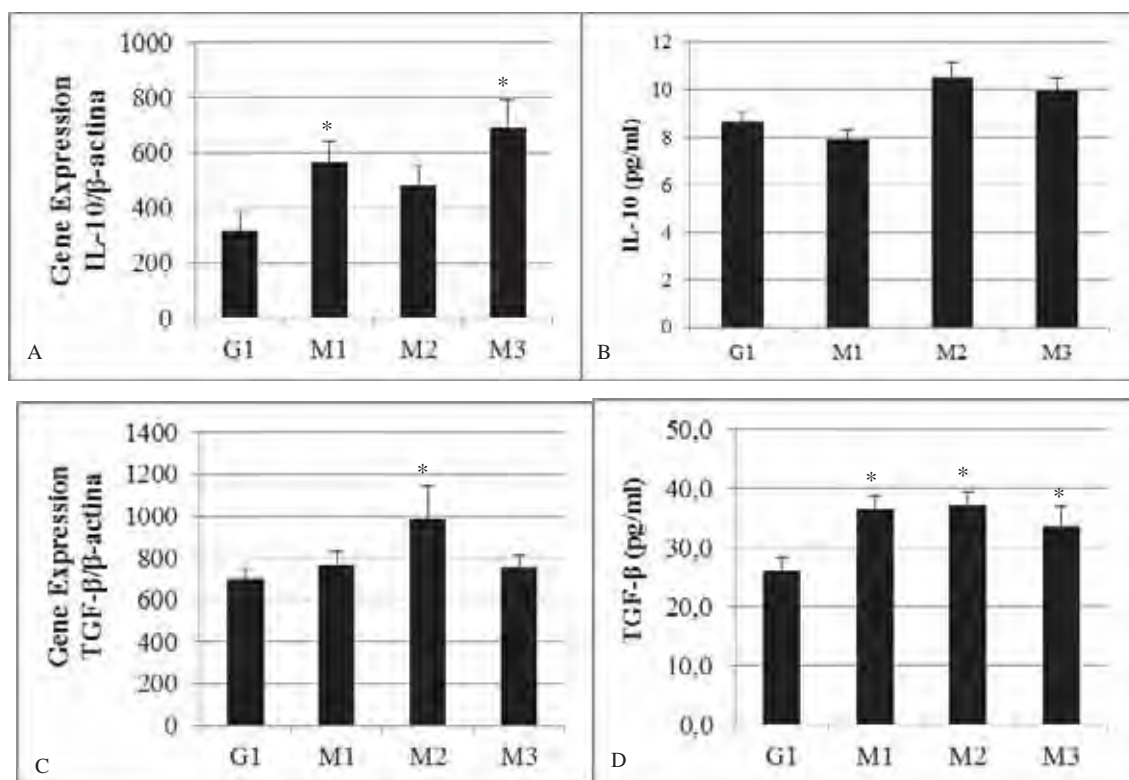


Figura 3A, B, C e D: Expressão gênica do mRNA e produção de IL-10 (A,B) e TGF-β (C) no grupo controle (G1) e no grupo de pacientes durante o tratamento antituberculose (G2) nos três momentos: M1 (até 1 mês do tratamento); M2 (três meses de tratamento) e M3 (seis meses de tratamento). Os resultados estão representados pela média ± S.E.M (erro padrão da média). *p<0,05 quando comparados ao G1;