

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Cláudio Daniel Cerdeira

Influência do 4-Hidroxi-2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) sobre a formação de espécies reativas do oxigênio e de armadilhas extracelulares e na resposta microbica de neutrófilos humanos contra *Mycobacterium tuberculosis*

Alfenas

2015

Cláudio Daniel Cerdeira

Influência do 4-Hidroxi-2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) sobre a formação de espécies reativas do oxigênio e de armadilhas extracelulares e na resposta microbicida de neutrófilos humanos contra *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Alfenas

2015

Cerdeira, Cláudio Daniel.

Influência do 4-Hidroxi-2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) sobre a formação de espécies reativas do oxigênio e de armadilhas extracelulares e na resposta microbicida de neutrófilos humanos contra *Mycobacterium tuberculosis* / Cláudio Daniel Cerdeira. -- Alfenas, 2015.

101 f. --

Orientador: Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. NADPH Oxidase. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Estresse Oxidativo. 4. Neutrófilos. I. Brigagão, Maísa Ribeiro Pereira Lima. II. Título.

CDD: 572.5

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cláudio Daniel Cerdeira

Influência do 4-Hidroxi-2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) sobre a formação de espécies reativas do oxigênio e de armadilhas extracelulares e na resposta microbicida de neutrófilos humanos contra *Mycobacterium tuberculosis*

A banca examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Aprovada em: 27 de Julho de 2015.

Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão (Orientadora)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura: _____

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Assinatura: _____

Prof. Dr. Felipe Fornias Sperandio

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura: _____

Dedico esta conquista a todos que de alguma forma contribuíram nesta jornada, por todos os momentos de apoio e confiança e, dedico este momento, principalmente a Deus.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus familiares, pelo apoio durante esta jornada. A minha orientadora, Profa, Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão pela atenção, apoio técnico científico e suporte dispensados. Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco, pelo apoio técnico científico.

Gostaria de agradecer também a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte físico/financeiro e, a todos os funcionários do Laboratório Central de Análises Clínicas (LACEN)-UNIFAL e laboratórios de pesquisa em Microbiologia/Imunologia e Bioquímica da UNIFAL-MG, pelo apoio técnico e atenção dispensada.

Eu gostaria de agradecer especialmente a todos os voluntários pela doação de sangue, bem como pela disponibilidade, paciência e atenção dispensadas ao longo desta jornada.

RESUMO

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), o principal causador da tuberculose (TB), continua a representar um grave problema de saúde pública, principalmente em países de baixa e média renda. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo Mtb, com aproximadamente oito milhões de casos novos e quase três milhões de mortes anualmente por TB. Após a infecção pelo Mtb, a resposta imune desempenha papel preponderante para impedir o início da doença infecciosa, a TB, bem como de seu curso. Assim, os oxidantes (espécies reativas do oxigênio/nitrogênio [EROs/ERNs]) gerados no *burst* oxidativo de células fagocíticas como, os neutrófilos, são essenciais para uma efetiva resposta ao patógeno. O uso indiscriminado de suplementação antioxidante, atualmente muito comum entre a população, ou o uso terapêutico durante o tratamento da TB, poderia comprometer a resposta imune frente às micobactérias, portanto, predispondo a uma maior susceptibilidade ao Mtb e/ou TB. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar *ex vivo* a influência do antioxidante sintético da classe dos nitróxidos, o 4-Hidroxi-2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol), sobre a resposta microbida de neutrófilos contra *M. tuberculosis*. Neutrófilos humanos foram isolados por gradiente de densidade a partir de sangue total de voluntários saudáveis. Para avaliar o *burst* oxidativo na ausência ou presença do Tempol, *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 35177) foi incubado a 37 °C com neutrófilos a multiplicidades de infecções (MOI) variando de 1 a 100. A liberação de anions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelos neutrófilos foi avaliada através do ensaio de redução do citocromo c. O ensaio de quimioluminescência amplificada com o Luminol foi utilizado para avaliar EROs/ERNs total e com Isoluminol para extracelular. Complementarmente, o ensaio de *killing* foi realizado para verificar a capacidade microbida total dos neutrófilos tratados ou não com Tempol. Neste teste, foi adotado o protocolo "dois passos", em que, Mtb foi incubado com neutrófilos (por 10, 30 e 90 min a 37 °C) e, através de uma centrifugação diferencial (100 x g, 5 min) e lise dos neutrófilos com H_2O pH 11, as micobactérias intracelular e extracelular foram quantificadas e os resultados reportados em Unidades Formadoras de Colônia (UFC), após uma incubação das micobactérias por 21 dias a 37 °C. Através deste protocolo, as taxas de fagocitose (K_p) e morte intracelular (K_k) do Mtb foram calculadas. Paralelamente foi avaliada a possível atividade tóxica do Tempol sobre neutrófilos, tendo sido observado que Tempol a uma concentração de 500 μM não foi citotóxico. O *burst* oxidativo dos neutrófilos contra Mtb foi significativamente diminuído na presença do Tempol (450 μM , $p < 0,05$) para todos os oxidantes avaliados. Esta concentração também foi capaz de diminuir a capacidade microbida dos neutrófilos, em que o número de UFC de *M. tuberculosis* no grupo tratado com Tempol foi significativamente maior que no grupo controle ($p < 0,05$). Curiosamente, Tempol diminuiu o K_k dos neutrófilos, mas não teve nenhum efeito sobre a seu K_p . Este estudo fornece informações sobre a influência de antioxidantes sobre a resposta imune contra o *M. tuberculosis*, de modo que as implicações clínicas para a prevenção e tratamento da tuberculose deve levar em conta estes achados.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, NADPH oxidase, estresse oxidativo, Tempol, NET.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the main cause of tuberculosis (TB), remains as a serious public health problem, chiefly in low- to middle-income countries. It is estimated that about one-third of the world's population has latent TB, with about eight million new cases and roughly three million deaths each year from TB. The innate immune response following Mtb infection plays a crucial role in preventing the onset of active TB, as well as its course. Thus, phagocytes-derived reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) during the oxidative burst (e.g., generated by neutrophils) are essential to an effective response to the pathogen. The indiscriminate use of antioxidant supplements, currently very common among the population, or their use as adjuvant therapy during TB treatment, could compromise the immune response to Mtb accordingly potentially increasing the host's susceptibility to Mtb/TB. In this context, the aim of this study was to investigate the *ex vivo* effect of the cyclic nitroxide tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetra-methyl-1-piperidinyloxy), an antioxidant with superoxide dismutase mimetic properties, on the microbicide response of neutrophils against *M. tuberculosis*. Human neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by Ficoll density gradient centrifugation. To assess the oxidative burst in the absence or presence of Tempol, *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 35177) was incubated at 37 ° C with neutrophils at multiplicity of infection (MOI) ranging from 1 to 100. ROS generation ($O_2^{\bullet-}$) by neutrophils was evaluated by using the cytochrome *c* reduction assay. The total and extracellular ROS were determined using the luminol- and Isoluminol-amplified chemiluminescence assay. Complementarily, the killing assay was performed to check the total microbicide capacity of neutrophils treated or not with Tempol. In this test, the "two-step" protocol was adopted in which, Mtb was incubated with neutrophils (for 10, 30, and 90 min at 37 °C) and, by differential centrifugation (100 x g 5 min) and lysis of neutrophils with H₂O pH 11, the intracellular and extracellular mycobacteria were incubated for 21 days at 37 ° C and, mycobacteria were quantified and results the ensuing reported as number of Colony Forming Units (CFU). Through this protocol, were calculated the phagocytosis (K_p) and intracellular killing (K_k) rates for *M. tuberculosis*. The possible toxic activity of Tempol was evaluated on neutrophils and, was observed that 500 μM tempol was not cytotoxic. The oxidative burst of neutrophils against Mtb was significantly decreased in the presence of 450 μM Tempol, for all evaluated oxidants ($p < 0.05$). Treatment of neutrophils with 450 μM Tempol decreased the total microbicidal activity against *M. tuberculosis*, since colony-forming units of these mycobacteria in the treated group were significantly higher than those for the untreated group ($p < 0.05$). Strikingly, Tempol (450 μM) decreased the k_k of neutrophils, but had no effect on their k_p . This study provides insights of the influence of antioxidants on the immune response to *M. tuberculosis*, so that clinical implications for the prevention and treatment of TB should take into account these findings.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, NADPH oxidase, oxidative stress, Tempol, Neutrophil extracellular traps.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos diferentes sistemas NOX encontrados em humanos.....	18
Figura 2. Representação esquemática da formação das espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) em fagócitos.....	19
Figura 3. Ativação e montagem do complexo NADPH oxidase em fagócitos.....	20
Figura 4. Modelo esquemático da formação de NET.....	23
Figura 5. Representação esquemática do sutil limiar entre o que é fisiológico e patológico no corpo humano como uma consequência do balanço redox na produção das espécies reativas do oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs).....	24
Figura 6. Estruturas químicas do Tempol, onde se destaca o elétron desemparelhado centrado no oxigênio (Fig. 6. a.).....	25
Figura 7. Representação esquemática da formação das espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) em fagócitos e possíveis ações do Tempol sobre estes oxidantes.....	29
Figura 8. Representação esquemática da formação das espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) em fagócitos e seus possíveis mecanismos sinalizadores durante a resposta microbicide.....	30
Figura 9. Estimativa por país para os novos casos de Tuberculose para cada 100.000 pessoas.....	40
Figura 10. Possíveis desfechos da ação de neutrófilos frente a patógenos.....	43
Figura 11. Interação entre macrófagos e neutrófilos durante a formação de armadilhas extracelulares por estes fagócitos em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ou contra outras micobactérias.....	45
Figura 12. Valores de nmols de $O_2^{\cdot -}$ / 10^6 neutrófilos/3 horas produzidos por neutrófilos nas diferentes condições experimentais.....	54
Figura 13. Avaliação do <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos, reportados em unidade relativa de luz (URL) nas diferentes condições experimentais.....	55
Figura 14. Possíveis ações do Tempol sobre as espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) geradas por fagócitos.....	62
Figura 15. Representação esquemática dos possíveis oxidantes afetados pela ação do Tempol.....	63
Figura 16. Número de unidade formadora de colônias (UFC) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , na presença ou ausência do Tempol (450 μM), após 90 min. de incubação.....	65

Figura 17. Avaliação da capacidade microbicida dos neutrófilos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> nos tempos de 10, 30 e 90 min. de incubação, tratados ou não com Tempol.....	65
Figura 18. Avaliação da capacidade microbicida dos neutrófilos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em agar <i>Middlebrook 7H10</i>	67
Figura 19. Comparação da atividade microbicida dos neutrófilos humanos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb) nos diferentes tempos avaliados, na presença ou ausência do Tempol.....	68
Figura 20. Taxas de fagocitose (K_p) e Killing (K_k) dos neutrófilos frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> nos grupos não tratados, tratados com Tempol ou com DPI.....	69
Figura 21. Representação esquemática dos possíveis mecanismos sinalizadores desempenhados por espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) durante a resposta microbicida e os possíveis alvos do Tempol.....	74
Figura 22. Representação esquemática das espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) afetadas pelo Tempol durante a sinalização desempenhada por estes oxidantes durante a resposta microbicida.....	75
Figura 23. Possíveis mecanismos sinalizadores afetados pela ação do Tempol sobre as espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) em fagócitos durante a resposta microbicida ou em outras situações patológicas.....	76
Figura 24. Avaliação da viabilidade dos neutrófilos (em %)......	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AhpC - *Alkylhydroperoxidase reductase subunit C*
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- ATP - *Adenosine Triphosphate*, trifosfato de adenosina
- BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes
- BSA - *Bovine serum albumin*, albumina do soro bovino
- cfDNA - *cell-free DNA*, DNA livre de células
- CFP-10 - *Culture filtrate protein 10*
- CFU - *colony-forming unit*, unidades formadoras de colônias
- CR3 - *Complement receptor type 3*
- DNA - *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico
- DPI - *Diphenyleneiodonium chloride*
- Duox - Dual oxidase
- EETs - *Eosinophils extracellular traps*, armadilhas extracelulares de eosinófilos
- ERNs - Espécies reativas do nitrogênio
- ERO1 - *Oxidoreductin 1*
- EROs - Espécies reativas do oxigênio
- ESAT-6 - *Early secretory antigenic target 6*
- ETs - *Extracellular traps*, armadilhas extracelulares
- FC - Fator corda
- fMLP - *N-formil-metionil-leucil-fenilalanina*
- HIV - *Human Immunodeficiency Virus*, Vírus da imunodeficiência humana
- hROS - *highly reactive oxygen species*, espécies altamente reativas do oxigênio
- Hsp72 - *heat shock protein 72*, proteína de choque térmico 72
- IL - *Interleukin*, Interleucina
- INF γ - *Interferon-gamma*, Interferon gama
- iNOS - *Inducible nitric oxide synthase*, Óxido nítrico sintetase induzida
- KatG - Catalase-peroxidase G
- MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*, proteína cinase ativada por mitógenos
- MCETs - *Mast cells extracellular traps*, armadilhas extracelulares de mastócitos
- MDR-TB - *Multidrug-resistant tuberculosis*, TB resistente a múltiplas drogas
- MLJ - Meio Löwenstein Jensen

METs: *Macrophages extracellular traps*,
MOI - Multiplicidade de infecção
MPO - Mieloperoxidase
Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*
mTOR - *mammalian target of rapamycin*, alvo da rapamicina nos mamíferos
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide
NADPH - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NADPH oxidase – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase complex*, Complexo Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NETs - *Neutrophils extracellular traps*, armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-κB - nuclear factor-kappaB, fator nuclear κB
NOX2 - NADPH oxidase isoform, isoforma da NADPH oxidase
Nox - Catalytic subunit of NADPH oxidases, subunidade catalítica das NADPH oxidases
OD – Optical density, densidade óptica
PAD4 - Peptidylarginine deiminase 4
pH - potencial hidrogeniônico
PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns, padrões moleculares associados ao patógeno
PBS - *Phosphate Buffered Saline*, Tampão fosfato-salino
Phox - Phagocyte oxidase
PKC - *Protein kinase C*,
PMA - Ester phorbol 12-myristate 13-acetate
PRRs - *Pattern recognition receptors*, receptores de reconhecimento dos padrões
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
SNPs - *Single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de nucleotídeo único
SOD - *Superoxide dismutase*, Superóxido dismutase
TB - Tuberculose
TG - Tapsigargina
TLRs - *Toll-like receptors*
TNF- α - *Tumor necrosis factor α*; Fator de necrosi tumoral α
UAF - unidades arbitrárias de fluorescência
UFC - Unidade formadora de Colônia
XDR-TB - *Extensively drug-resistant TB*, TB extensivamente resistente às drogas

O_2 - Oxigênio molecular

$O_2^{\bullet -}$ - Ânion superóxido

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HO^{\bullet} - Radical hidroxila

$HOCl$ - Ácido hipocloroso

OCI^- - Ânion hipoclorito

$^1\Delta_g O_2$ - Oxigênio singlete

$\bullet NO$ - Óxido nítrico

$ONOO^-$ - Peroxinitrito

e^- - elétron

Ca^{+2} - Íon Cálcio

Mg^{+2} - Íon Magnésio

Zn^{2+} - Íon Zinco

Fe - Ferro

Fe^{2+} - Íon Fe

Fe^{3+} - Íon Fe

$CaCl_2$ - Cloreto de Cálcio

$MgCl_2$ - Cloreto de Magnésio

$NaCl$ - Cloreto de Sódio

KCl - Cloreto de Potássio

H_2O - Água

$M\Phi$ - Macrófago

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Oxidantes: histórico, origem e importância na saúde e nas doenças.....	15
2.2. Antioxidantes.....	24
2.3. Dependência do complexo NADPH oxidase para a formação das armadilhas extracelulares.....	26
2.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e a Tuberculose (TB).....	38
3. OBJETIVOS.....	46
4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....	47
4.1. Reagentes e solventes.....	47
4.2. Cultivo do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e preparo do estímulo.....	48
4.3. Obtenção dos neutrófilos.....	48
4.4. Mensuração da atividade do sistema NOX2 dos neutrófilos.....	49
4.5. Teste de capacidade microbicida dos neutrófilos contra <i>M. tuberculosis</i>	51
4.6. Determinação de viabilidade celular e ensaio de toxicidade do Tempol.....	52
4.7. Análises dos dados.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8. APÊNDICE A.....	98
9. ANEXO A	100

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas continuam a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (CHANDRA, 2010; WHO, 2012). Como forma de defesa do organismo, a resposta imune inata a várias infecções tem como fator primordial a liberação de oxidantes por fagócitos, denominados espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs). Este evento, catalisado pelo complexo NADPH oxidase (isoforma NOX2) é referido como *burst* respiratório ou *burst* oxidativo, e sua diminuição ou ausência tem sido associada a prognósticos desfavoráveis durante o curso de diferentes doenças infecciosas (BROWN et al., 2009; MARTÍNEZ & ANDRIANTSITOHAINA, 2009; ALFADDA & SALLAM, 2012). Diferentes estudos têm estabelecido a ligação entre a formação de oxidantes e a efetividade na defesa do hospedeiro contra o *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da Tuberculose (TB) (MACMICKING et al., 1997; BOGDAN et al., 2000; SINGH et al., 2008).

O aumento na formação de ERO/ERN em humanos está associado a fatores ambientais, tais como, os danos químicos induzidos pela metabolização de fármacos ou quando da exposição a fontes de radiação, ou, ainda, a fatores que induzem o aumento da necessidade energética, com sobrecarga da função da cadeia respiratória mitocondrial, o que ocorre, com uma carga excessiva de exercícios físicos (GUARATINI et al., 2006; NATHAN & CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013).

Controle do ciclo celular (SUZUKI et al., 1999; MACIP et al., 2002; DARWICHE et al., 2007), sinalização bioquímica (DUDA et al., 2002; STORZ, 2006; D'AUTRÉAUX & TOLEDANO, 2007; HANCOCK, 2009), diferenciação celular (SARDINA et al., 2010) e, apoptose (SUZUKI et al., 1999; Le BRAS et al., 2005; KIM et al., 2010) são alguns exemplos de mecanismos nos quais os oxidantes participam, desde que, em ideais concentrações. Por outro lado, doenças crônico-degenerativas e eventos patológicos têm suas gêneses metabólicas implicadas como um resultado de quando a quantidade de ERO/ERN excede a capacidade de defesa antioxidante do organismo, no chamado “estresse oxidativo”, causando danos a importantes macromoléculas como, as proteínas, os carboidratos, os lipídeos, o RNA e, o DNA (STORZ, 2006). Esta disrupção na homeostase redox pode ter como consequência as, complicações vasculares no diabetes (TIWARI et al., 2013), alterações cardiovasculares (YOSHIDA, 1996; LEE et al., 2005; LONN et al., 2005; COOK et al., 2007), câncer (OMENN et al., 1996; MANDA et al., 2009), doenças neurodegenerativas (STORZ, 2006; GRODSTEIN et al., 2007; ZHOU et al., 2007; JOMOVA et al., 2010), infertilidade

(SHARMA & AGARWAL, 1996) e, as doenças inflamatórias (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; TSUHAKO et al., 2010).

Diante disto, torna-se cada vez mais comum o uso de suplementos que contém compostos com atividade antioxidante, em parte justificados por suas propriedades terapêuticas (MEAGHER & RADER, 2001; LEE et al., 2005; LONN et al., 2005; COOK et al., 2007; BRAMBILLA et al., 2008; TSUHAKO et al., 2010). Durante a TB ativa, que requer alta rigorosidade na adesão e um prolongado uso dos medicamentos constantes em uma das linhas de fármacos anti-TB, têm sido relatado em pacientes, intenso estresse oxidativo, isto, proveniente de tal terapia. Como forma de resolver esta reação adversa aos medicamentos constantes na terapia da TB, estudos têm reportado a utilidade do uso de suplementos antioxidantes (como o resveratrol) por parte de pacientes durante o tratamento da TB, justificados pela restauração dos níveis de glutathione (BUTOV et al., 2013). Contudo, a preocupação cada vez mais crescente por parte da população quanto ao uso de suplementos antioxidantes e, a necessidade terapêutica de tal uso, pode conduzir a um novo problema de saúde pública, uma vez que a alteração no balanço do metabolismo entre a formação de ERO/ERN e as defesas endógenas de sua regulação, está relacionada ao aparecimento de efeitos indesejados, especialmente a predisposição às infecções por patógenos, quando há redução de EROs (HERCBERG et al., 2007; SCHROECKSNADEL et al., 2007).

Uma vez que o equilíbrio redox do organismo é necessário para a defesa contra patógenos e à manutenção da saúde (D'AUTRÉAUX & TOLEDANO, 2007), o conhecimento das possíveis interferências dos antioxidantes na resposta a microrganismos é de fundamental importância na prevenção de um possível uso indiscriminado ou em condições críticas de susceptibilidade a infecções.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Oxidantes: histórico, origem e importância na saúde e nas doenças

Viver com o risco de estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo é uma condição que organismos vivos têm de correr, devido às diferentes rotas metabólicas de produção de ERO/ERN, bem como às adaptações das demandas energéticas mais eficientes que acabam por produzir espécies oxidantes em excesso (ANDREYEV et al., 2005; REGOLI et al., 2013). Dentre estas, os radicais livres são espécies químicas que apresentam elétrons desemparelhados, sendo reativas em variados graus, dependendo do seu potencial de óxido-redução (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Fontes exógenas, como radiação ultravioleta e gama e metabolismo de fármacos são responsáveis pela formação de espécies oxidantes no organismo. Por outro lado, um considerável número de fontes endógenas são geradoras de tais espécies, como a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial; os sistemas enzimáticos NADPH oxidase; flavoenzimas (ERO1); xantina oxidase; óxido nítrico sintetase; lipooxigenases; ciclooxigenases; complexo do citocromo P₄₅₀, entre outros (NATHAN & CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013). Apesar desta produção endógena, o organismo possui sistemas de detoxificação, mantendo o equilíbrio funcional de forma dinâmica. Os sistemas antioxidantes das enzimas superóxido dismutases, catalase, glutationa-peroxidase e redutases são os principais responsáveis por este equilíbrio. Compostos de baixa massa molecular, como o ascorbato, piruvato, α -cetoglutarato, ácido úrico e oxaloacetato também participam da manutenção do equilíbrio redox celular (NATHAN & CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013).

Após o reconhecimento da importância da formação de radicais livres em organismos vivos, tendo como gênese metabólica os processos redox envolvendo as biomoléculas, uma enorme quantidade de estudos buscou explorar os lados positivos e negativos destas espécies reativas, bem como uma melhor compreensão das alterações quantitativas que as envolve. O primeiro artigo científico a respeito foi publicado por volta de 1945 (ALFADDA & SALLAM, 2012), e abriu caminho para que, nos anos posteriores, tanto os processos benéficos quanto os deletérios advindos da produção de ERO/ERN começassem a ser desvendados pelo acúmulo de evidências científicas, e as relações dos compostos oxidantes, especialmente dos radicais livres, com alguns processos patológicos e doenças começaram a ser cogitadas (BALISH et al., 2005).

A controvérsia quanto às atividades biológicas dos oxidantes são fruto da complexidade que envolve o balanço dos processos redox no organismo. Assim, a sutileza do limiar entre o que é fisiológico e o que passa a ser patológico dependem de complexos fatores e, a dualidade dos oxidantes é destacada (SCHROECKSNADEL et al., 2007; BARTOSZ, 2009).

O possível papel benéfico de oxidantes sobre o sistema imunológico e a ação frente a patógenos é pleiotrópico, patógeno-específico e controverso, tanto em estudos *in vitro* quanto em realtos *in vivo*. Em processos infecciosos e/ou inflamatórios, a produção de ERO/ERN é um processo vital na defesa do organismo, e se inicia quando o fagócito recebe estímulos para o englobamento do microrganismo, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, as quais geram um aumento abrupto do consumo de oxigênio. Este processo, denominado *burst* respiratório ou *burst* oxidativo, não utiliza o O₂ para a síntese de ATP através da respiração mitocondrial. Através de um complexo enzimático (o NOX 2, **Figura 1.**), o O₂ é transformado em ânions superóxido (O₂^{•-}) os quais podem sofrer dismutação espontânea ou enzimática da superóxido dismutase (SOD), gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Partindo do H₂O₂, através da ação da enzima mieloperoxidase (MPO), são formados oxidantes mais reativos como o radical hidroxila (HO[•]), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete (¹Δ_g O₂), também denominadas espécies altamente reativas do oxigênio (do inglês *highly reactive oxygen species*, hROS). Ainda, com ativação de óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), o óxido nítrico (•NO) reage rapidamente com O₂^{•-}, originando peroxinitrito (ONOO⁻), um potente antimicrobiano. O processo de formação destes oxidantes em fagócitos é resumido na **Fig. 2.** abaixo.

Estes compostos, por apresentarem grande reatividade com macromoléculas, são potencialmente capazes de matar corpos estranhos ao organismo (MOHAMMADI et al., 2013). O *burst* respiratório é o evento central da fagocitose. Este mecanismo microbicida oxidante dos fagócitos é mediado por um complexo enzimático, associado à sua membrana citoplasmática e à membrana dos grânulos específicos, chamado NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) oxidase, hoje redenominada sistema NOX2 (BROWN & GRIENGLING, 2009). Em células não estimuladas, o sistema NOX2 está dormente e dissociado, com componentes presentes tanto no citosol quanto na membrana de grânulos secretórios, podendo ser rapidamente ativado quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados. A ativação do *burst* respiratório envolve profundas mudanças de localização e atividades de diferentes componentes deste complexo enzimático (SEGAL, 2008).

O termo “*burst* respiratório” ou “*burst* oxidativo”, é assim referido devido a intensa produção de $O_2^{\cdot-}$ através do complexo NADPH oxidase, em neutrófilos. NADPH oxidases são complexos multiproteicos e compreendem uma família de enzimas ligadas à membrana que geram $O_2^{\cdot-}$ em ambos os compartimentos, extracelulares ou intracelulares. A muito tempo os fagócitos são conhecidos por expressar grandes quantidades de NADPH oxidase que residem na membrana plasmática ou nas membranas fagossomais, mas valores intermediários ou baixos deste complexo ocorrem na maioria, se não em todos os tipos de mamíferos, de células e tecidos. O complexo NADPH oxidase de fagócitos (NOX 2) consiste de um componente transmembranar, associado a membrana de fagócitos ou de fagossomos durante a fagocitose, o citocromo b_{558} , referido como o terminal do transporte de elétrons, formado por uma subunidade maior, a $gp91^{phox}$ (subunidade transmembranar, também conhecida como NOX 2), e uma menor, a $p22^{phox}$ e de outros componentes “phox” solúveis encontrados no citoplasma ($p47^{phox}$, $p40^{phox}$, e $p67^{phox}$) de fagócitos em repouso, além de uma guanosina trifosfatase (GTPase, Rac1 ou Rac2). A subunidade $gp91^{phox}$ foi encontrado por ter vários homólogos em complexos NADPH oxidase não fagocíticos (outras NOX, expresso em outras células que não fagócitos, **Fig. 1.**). Juntamente com $gp91^{phox}$, estes homólogos foram reunidas na família NOX, compreendendo NOX1, NOX2 (= $gp91^{phox}$), NOX3, NOX4, NOX5, e também DUOX (dual-oxidase) 1 e 2 (Todos os diferentes sistemas NOX são mostrados na **Fig. 1.**). Os complexos NADPH oxidase não fagocíticos diferirem de NOX-2 (complexo fagocítico) na estrutura molecular, localização subcelular e função bioquímica (STOIBER et al., 2015).

O complexo NADPH oxidase pode se apresentar em diferentes estados (em repouso, “primados”, ativo ou inativo, **Fig. 3.**). Em fagócitos não estimulados, o complexo NADPH oxidase está dormente e dissociado em componentes presentes no citosol ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$ e $p40^{phox}$), e na forma de complexo quando na membrana de vesículas secretórias e grânulos específicos ($gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$), onde se associam a uma flavoproteína (**Fig. 3.**). Moléculas sinalizadoras e outros agentes são capazes de induzir a montagem das subunidades e posterior ativação, incluindo as citocinas pró-inflamatórias, microrganismos e derivados microbianos (LPS, fMLP, entre outros), agonistas de receptores Toll-like (TLR), e agentes químicos, tais como o PMA e, bem como será descrito na sequência, estes agentes são em grande parte os mesmos daqueles responsáveis pela indução de ETs/ETOs. Para o complexo ser funcional, é requerido a fosforilação de subunidades das proteínas (por exemplo, $p47^{phox}$) por MAPK, e a translocação dos componentes citosólicos ($p47^{phox}$, $p40^{phox}$, $p67^{phox}$ e Rac) até as membranas, ligando se posteriormente aos sítios do citocromo b_{558} , deste modo, levando a montagem do

complexo, que passa a ser funcional. A região do citocromo b_{558} corresponde ao sítio de ligação de FAD e NADPH. As vias de regulação da montagem do complexo NADPH oxidase variam dependendo dos estímulos moleculares envolvidos, como exemplos, em neutrófilos, PMA é um potente indutor do complexo por atuar direto sobre a proteína quinase C, ao passo que o fMLP requer a prévia ativação de vias como PI3K/AKT/mTOR (STOIBER et al., 2015).

Uma vez montado e ativado, o complexo NADPH oxidase catalisa a oxidação do NADPH, gerando $\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + \text{e}^-$. Os elétrons desprendidos são transportados através do gradiente de potencial de redução gerado, e transferidos para o FAD e, em seguida, para o aceptor final, o oxigênio molecular (O_2), sendo assim, formando os ânions superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Isto permite uma posterior cascata de geração de outros EROs (Fig. 2.), que continua com a rápida conversão de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , quer espontaneamente ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD). O processo pode então proceder à formação de ácido hipocloroso (HOCl) pela ação de MPO sobre o H_2O_2 . HOCl é capaz, por sua vez, de voltar a reagir com o H_2O_2 para gerar $^1\text{O}_2$. A disponibilidade de metais de transição (por exemplo, o Ferro) especificamente pode permitir que o H_2O_2 entre na reação de Fenton, formando o altamente reativo radical hidroxila (HO^{\bullet}). Outras reações podem seguir sob determinadas condições, tais como a produção de óxido nítrico (NO) por iNOS, e isto pode implicar novamente em reações consecutivas, por exemplo, do NO com O_2 para formar peroxinitrito (STOIBER et al., 2015).

Figura 1. Representação esquemática dos diferentes sistemas NOX encontrados em humanos.

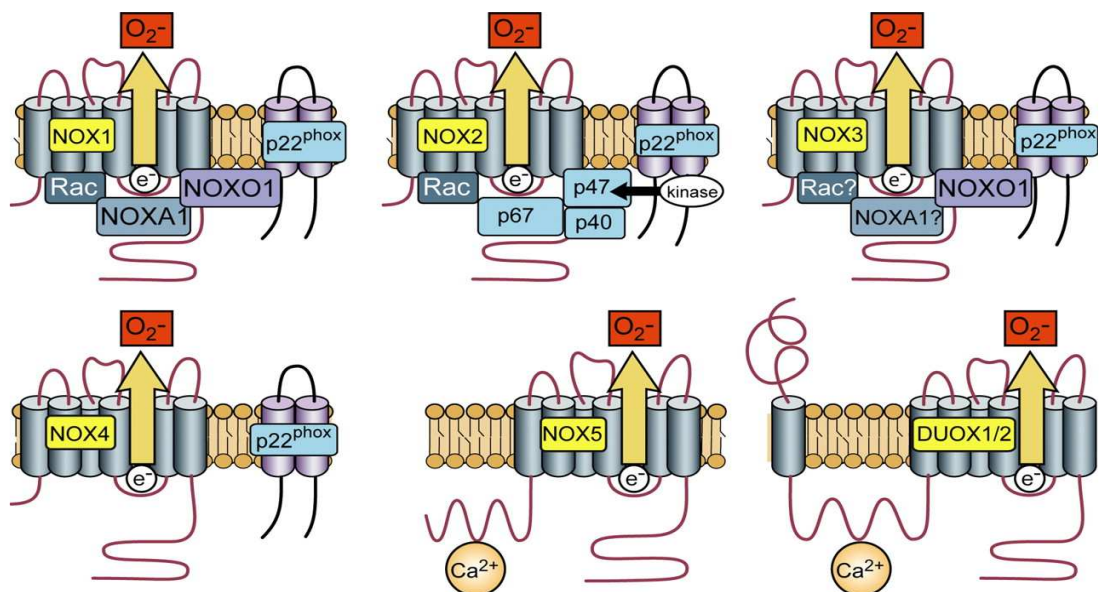
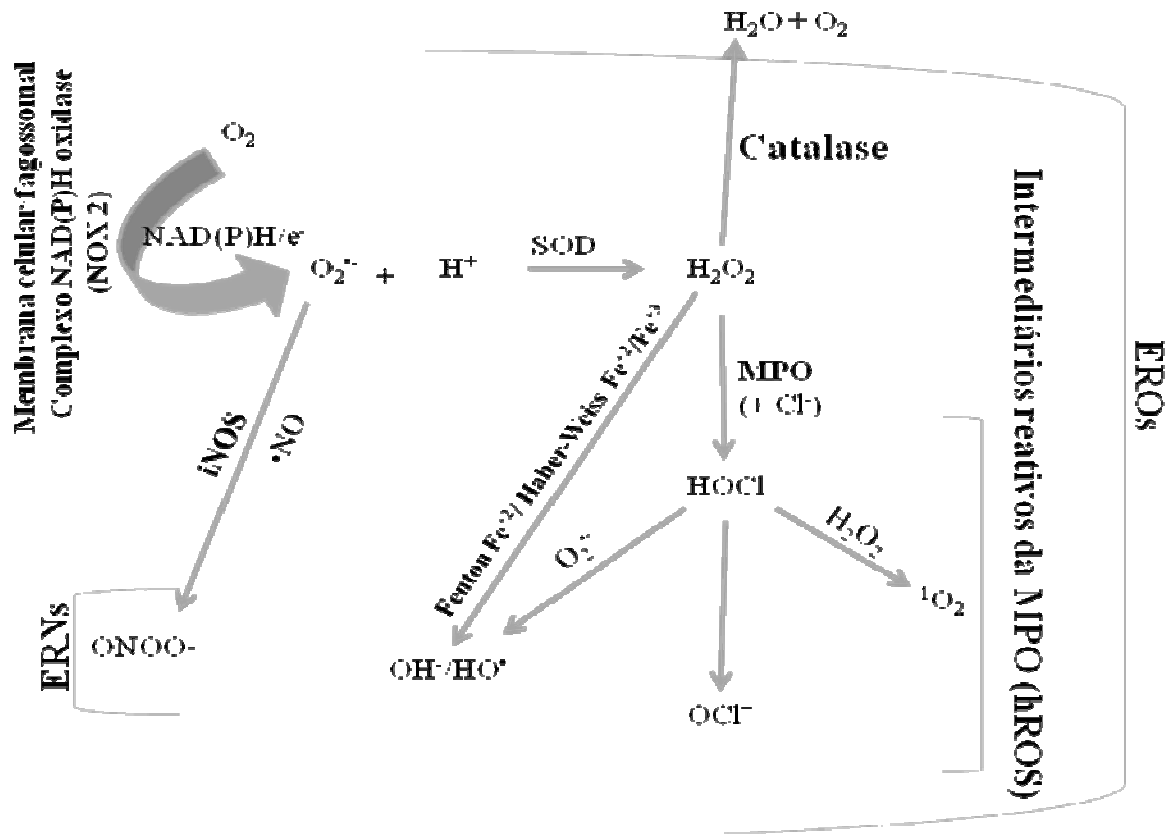


Figura 2. Representação esquemática da formação das espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) em fagócitos.



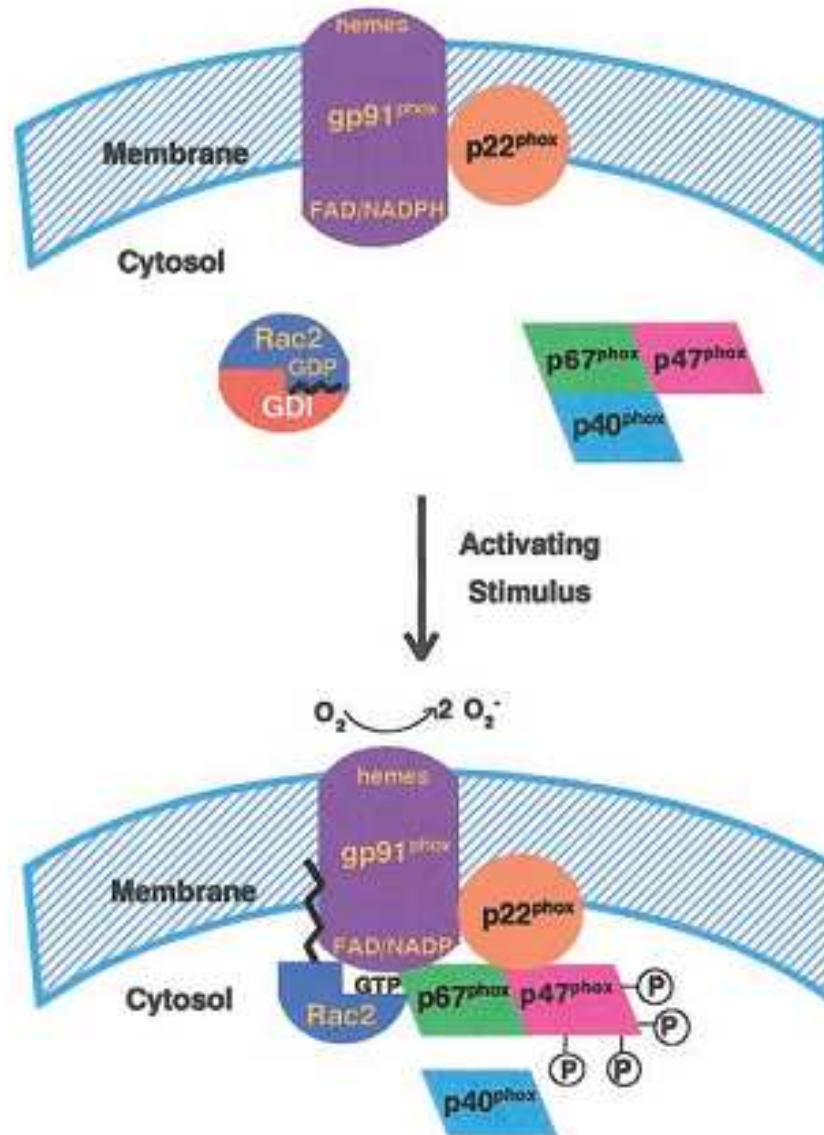
Legenda: NAD(P)H nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; EROs/ERNs: espécies reativas do oxigênio/nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; MPO: mieloperoxidase; SOD: superóxido dismutase; hROS: espécies altamente reativas do oxigênio (*highly reactive oxygen species*); O₂⁻: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; HOCl: ácido hipocloroso; OCl⁻: anion hipoclorito; ¹O₂: oxigênio singlete; •NO: óxido nítrico; HO•: radical hidroxila; H₂O₂: peróxido de hidrogênio. Pela ação da MPO fagocítica, são formadas as hROS.

A princípio, durante o *burst* oxidativo dos fagócitos, o O₂⁻ é formado através do complexo NADPH oxidase (sistema NOX-2). A seguir, ele sofre ação da SOD, ou dismutação espontânea, gerando o H₂O₂, que pode entrar na via de Fenton e gerar HO• e/ou sofrer ação da MPO e gerar OCl⁻, HO•, ou ¹O₂. Ainda, o O₂⁻ pode interagir com o •NO para gerar ONOO⁻.

Observação: Neste esquema de representação esquemática, é apresentado uma extremamente simplificada visão geral, portanto, as reações químicas/interações não estão balanceadas.

Fonte: Autor

Figura 3. Ativação e montagem do complexo NADPH oxidase em fagócitos



Legenda: Os componentes funcionais conhecidos envolvidos na ativação são apresentados: o citocromo b₅₅₈, que consiste nas subunidades gp91^{phox} e p22^{phox}, os componentes citossólicos, p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} e o Rac2 GTPase em complexo com a proteína reguladora GDI (inibidor de dissociação GDP). Em condições de repouso (na ausência de estímulo dos neutrófilos), os componentes estão separados, gp91^{phox} e p22^{phox}, associados a membrana e, p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} e o Rac2, dissolvidos no citoplasma (parte superior da figura). Após a estimulação adequada dos neutrófilos humanos (como observado na figura, de cima para baixo), ocorre a fosforilação de alguns componentes (por exemplo, p47^{phox}), levando a ativação do complexo e translocação dos componentes citoplasmáticos (p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} e o Rac2) até a membrana, onde ocorre a montagem do complexo NADPH oxidase (como observado na figura, mais abaixo), dessa forma, tornando-o funcional para que ocorra a transferência de elétrons por gradiente de potencial de redução até o FAD que, subsequentemente, para o aceptor final, o oxigênio molecular (O₂), sendo assim, formado os ânions superóxido (O₂^{·-}).

Fonte: Bokoch & Diebold (2002).

A importância do sistema enzimático NOX-2 é claramente evidenciada em pacientes portadores de Doença Granulomatosa Crônica (DGC), que, devido a mutações autossômicas ou ligadas ao cromossomo X, em genes que codificam para as sub-unidades do complexo NADPH oxidase, tais pacientes não possuem capacidade de produzir quantidades normais de $O_2^{\bullet-}$ pelos fagócitos, estando, então, sujeitos a infecções recorrentes durante toda a vida (SEGAL, 2008; BUSTAMANTE et al., 2011).

Contudo, embora oxidantes tomem parte em importantes processos biológicos, o excesso deles podem provocar sérios danos às células e/ou tecidos. Como exemplos, os anions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), formados através do sistema NOX 2 fagocítico, apresentam decomposição enzimática (via SOD, **Fig. 2.**) na velocidade de aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ em pH 7. Atualmente, é bem conhecido o papel do $O_2^{\bullet-}$ no câncer, na gênese de doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas, apesar do $O_2^{\bullet-}$ apenas não ser capaz de danificar o DNA de forma direta (BATTIN et al., 2009). O radical hidroxila (HO^{\bullet}) apresenta decomposição espontânea, em torno de 10^{-9} segundos, restringindo sua localização nas proximidades onde são formados os anions superóxidos/ H_2O_2 . Este radical é altamente reativo e pode causar intenso dano intracelular, tendo grande potencial para oxidar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (BENZIE et al., 2000; SETSUKINAI et al., 2003; RÁC et al., 2015).

Representando o primeiro estado excitado do estado fundamental do oxigênio molecular, o 1O_2 pode reagir com todos às macromoléculas biológicas, além de alta reatividade com compostos de baixo peso molecular, tais como grupos tióis de aminoácidos. O tempo entre sua formação e decomposição (espontânea) pode variar dentro de 10^{-5} segundos (RIBEIRO et al., 2005). O oxigênio singleto é considerado um importante agente antimicrobiano gerado por fagócitos (RAGÀS et al., 2013). Por outro lado, o 1O_2 pode causar danos a importantes biomoléculas, através de reações químicas ou transferindo energia a elas. Assim, proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e lipídios são alvos do 1O_2 , tendo como consequência a formação de endoperóxidos, hidroperóxidos ou dioxetanos, com consequente dano oxidativo a estas macromoléculas, o que pode resultar no aparecimento de doenças, tais como alterações dermatológicas, danos oxidativos ao fígado e porfiria eritropoiética (KON et al., 2004; BRIVIBA et al., 2007). Além disso, o 1O_2 pode reagir com átomos de nitrogênio ou enxofre presente em aminoácidos, formando 1,2-dioxetanos, ou reagindo com aminoácidos fenólicos, gerando hidroperoxidienona (RONSEIN et al., 2006).

Os usos de alguns antibióticos bactericidas também têm sido apontados como grandes fontes de radicais livres, em parte, por seus metabolismos, ou para ativarem algumas vias metabólicas, os quais, em alguns casos, são considerados um efeito indesejável de seus usos. Porém em outras situações, podem ter desejáveis efeitos reforçadores da ação antimicrobiana, talvez explicando a possível controvérsia de sua possível ação antimicrobiana (FANG et al., 2004; CHANDEL & BUDINGER, 2013; KALGHATGI et al., 2013; MORONES-RAMIREZ et al., 2013). Reforçando este paradigma, adicional aos subjacentes mecanismos microbicidas dos oxidantes durante a resposta imune a patógenos, recentemente, Keren et al. (2013); Liu & Imlay (2013) demonstraram que as ações antimicrobianas *in vitro* de alguns antibióticos não são dependentes dos oxidantes, contrariando prévios estudos, em que se supunham que a ação de tais antimicrobianos dava-se pela indução da formação destas espécies reativas (DWYER et al., 2009; BRYNILDSEN et al., 2013).

Adicionalmente aos mecanismos microbicidas já conhecidos dos fagócitos polimorfonucleares, recentemente surgiram relatos na literatura de que os oxidantes que são gerados por NOX2 (BRINKMANN et al., 2004; RADIC & KAPLAN, 2013), especialmente H_2O_2 advindo da dismutação de $O_2^{\bullet-}$, estão de diferentes modos relacionados ao desprendimento intracelular de cromatina descondensada (nuclear e, em alguns casos, mitocondrial ou uma mistura de ambas) para o espaço extracelular, via citoesqueleto, complexada com grânulos proteicos com ação antimicrobiana (provenientes dos grânulos azurófilos [elastase e mieloperoxidase], específicos [lactoferrina] e terciários [catepsina e gelatinase]). Este complexo cromatina-grânulos é também conhecida como armadilha extracelular, que em neutrófilos é denominada de armadilha extracelular de neutrófilos (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps* [NETs], **Figura 4**). Esta estrutura é mais bem estudada em neutrófilos, embora eosinófilos (Armadilhas Extracelular de Eosinófilos, EETs), mastócitos (Armadilhas Extracelular da Mastócitos, MCETs) e monócitos/macrófagos (Armadilhas Extracelular de Macrófagos/monócitos, METs) também estejam aptas a executar tal mecanismo (GOLDMANN & MEDINA, 2013). Este mecanismo parece ser também uma forma de morte celular programada, diferente dos mecanismos clássicos de apoptose e necrose, sendo referido como *NETose*, em que a participação do Ca^{+2} , *peptidylarginine deiminase 4* (PAD4) e elastase são essenciais para a formação de NETs e posterior *NETose* (BRINKMANN et al., 2004; LI et al., 2010; PALMER et al., 2012).

O papel da mieloperoxidase (MPO) também é preponderante na formação de NET (METZLER et al., 2010), onde a ação desta enzima sobre H_2O_2 com produção de HOCl incrementa o desprendimento da armadilha extracelular, além da participação ativa desta

enzima na descondensação da cromatina (PALMER et al., 2012). A ativação de NET também é possível por outros mecanismos, não se limitando, desta forma, ao envolvimento de NOX2 (FUCHS et al., 2007; YOUSEFI et al., 2009).

A formação de NET parece responder especificamente a diferentes estímulos patógeno/químico-específicos e, a robustez desta resposta, também varia com o tipo de fagócito em questão, sendo que, a formação destas estruturas, tem sido identificada como uma forma de defesa em vertebrados, não se restringindo apenas aos humanos (BIANCHI et al., 2009; GABRIEL et al., 2010; PILSCZEK et al., 2010; JUNEAU et al., 2011; YOUNG et al., 2011; PALMER et al., 2012; GOLDMANN & MEDINA, 2013; STEPHAN et al., 2015; STOIBER et al., 2015). Recentemente, um mecanismo similar foi também descrito em *Crassostrea gigas* (ostra) como forma de defesa (POIRIER et al., 2014). O desprendimento de NETs foi recentemente dividido em duas fases: a primeira, não requer glicose exógena e uma glicólise satisfatória e, estendesse, até a descondensação de cromatina; a segunda fase, é dependente de glicose exógena e de uma intensa glicólise, talvez por requerer transporte ativo desta estrutura ao longo do citoesqueleto para a extrusão para o espaço extracelular (RODRÍGUEZ-ESPINOSA et al., 2015).

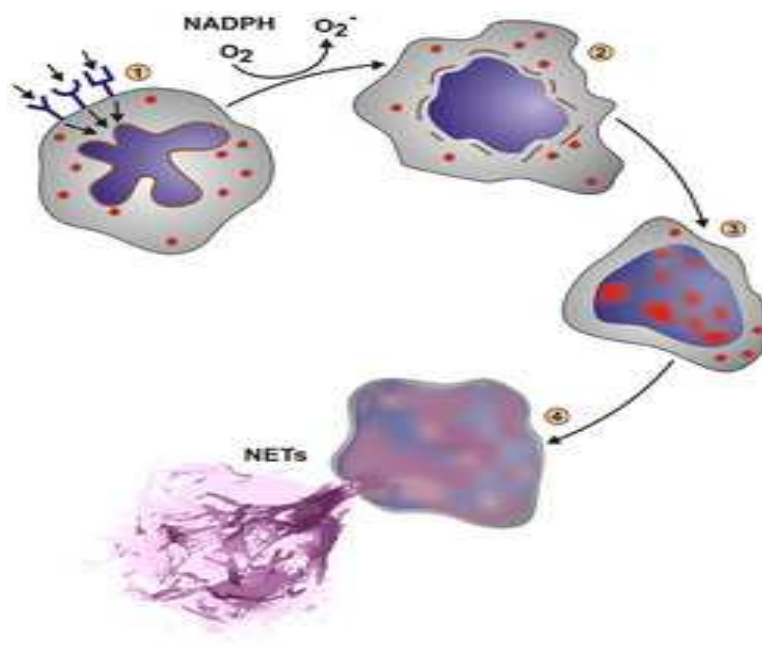


Figura 4. Modelo esquemático da formação de NET. O neutrófilo, sob os diferentes estímulos, libera oxidantes pela ação de NADPH oxidase (NOX2). Os oxidantes formados guiam a translocação de elastase e MPO presentes nos grânulos (1). Os grânulos secretórios se movem ao núcleo, simultaneamente à ruptura do envoltório nuclear, (2) cujos conteúdos se misturam ao fluido celular, concomitante a ação de elastase e MPO, onde elas auxiliam na descondensação da cromatina (3). Após descondensação da cromatina (também facilitado pela PAD-4 e Ca^{+2}), a NET formada por fitas de DNA impregnadas de proteínas com ação antimicrobiana e proteases de grânulos específicos do fagócito é liberada para o espaço extracelular através da interação com componentes do citoesqueleto (4).

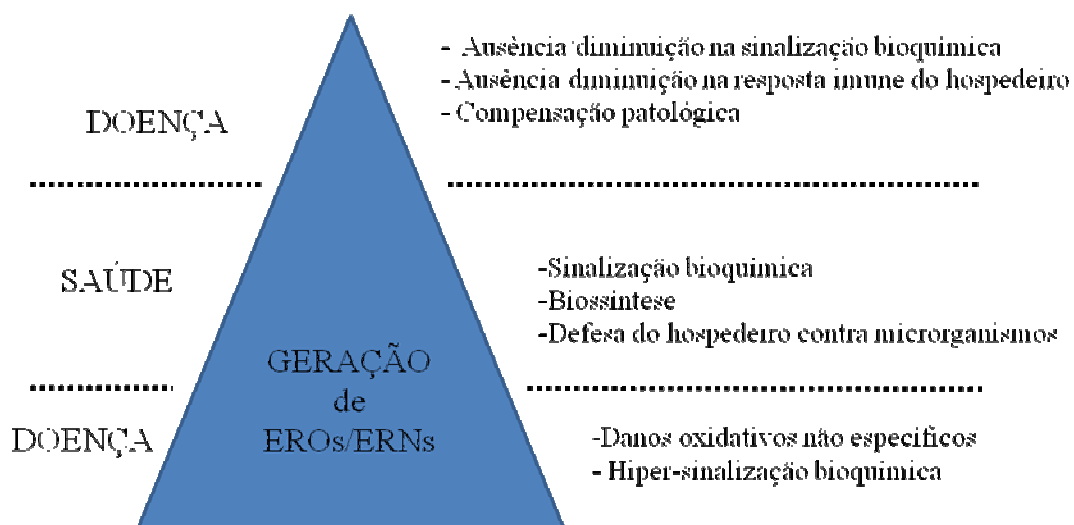
Adaptado de:

< http://www.mpg.de/4285697/NETs_immune_system?filter_order=LT&page=5&research_topic=BM>. Acesso em: 22 Out. 2013.

2.2. Antioxidantes

Uma vez em que o efeito dual dos oxidantes pode ocorrer *in vivo*, isto dependente de suas concentrações (**Fig. 5.**), naturalmente, organismos vivos dispõem de sistemas de controle do balanço redox. Dentre estes, a glutatona e a coenzima Q têm importantes papéis em humanos. Os antioxidantes ganharam a atenção da saúde pública quando cientistas começaram a entender os danos à saúde causados por oxidantes, especialmente os radiculares, em estágios iniciais de condições como aterosclerose, câncer, perda de visão, e outras condições crônicas. Assim, historicamente, o uso de antioxidantes, seja para fins estéticos ou terapêuticos, tem sido cientificamente justificado por apresentarem propriedades no controle do excesso dos oxidantes que podem gerar danos à saúde (GUTTERIDGE et al., 1994). É, hoje, cada vez mais comum o uso de antioxidantes, especialmente entre os praticantes de atividades físicas intensas e de indivíduos que buscam tratamentos rejuvenescedores (BRAMBILLA et al., 2008). Diante das premissas de benefícios com o uso desta classe de compostos, as indústrias alimentícias e de suplementos começaram a explorar estas propriedades para fins de marketing, o que vem rendendo milhões de dólares anualmente a elas com a venda de suplementos antioxidantes (HARVARD, disponível em: <http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/antioxidants/>).

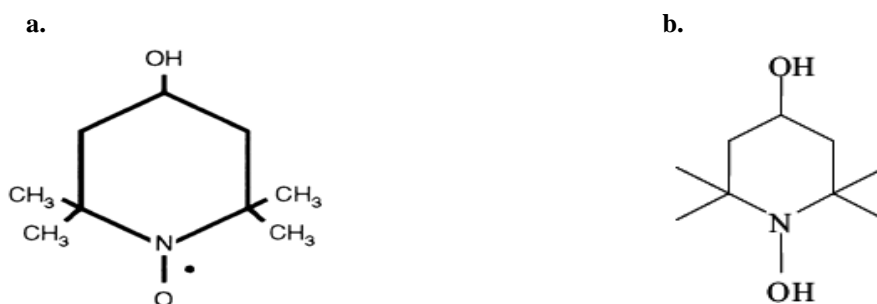
Figura 5. Representação esquemática do sutil limiar entre o que é fisiológico e patológico no corpo humano como uma consequência do balanço redox na produção das espécies reativas do oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs).



Antioxidantes sintéticos, como alupurinol, desferoxamina, propranolol, aminoesteróides, além das clássicas vitaminas C e E, atenuam o estresse oxidativo, dessa forma prevenindo ou atenuando os sintomas de algumas condições patológicas, como as cardiopatias induzidas por radicais livres, e podem ser utilizados para diferentes finalidades e adquiridos como forma de medicação ou suplementos (MEAGHER & RADER, 2001; SHITE et al., 2001). Contudo, na década de 90, surgiram dúvidas com relação aos possíveis efeitos pró-oxidantes das vitaminas (CARR & FREI, 1999). De acordo com Podmore et al. (1998), dependente da concentração, a vitamina C pode apresentar um efeito pró-oxidante, trazendo sérias consequências ao balanço redox celular e, levando, por exemplo, a oxidação de bases do DNA (JENNER et al., 1998).

Recentemente, iniciaram-se pesquisas com antioxidantes sintéticos da classe dos nitróxidos. Dentre eles, o 4-Hidroxi-2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol, **Figura 6.**) é um mimético da enzima SOD. Tempol é considerado um promissor protótipo, apresentando desejáveis características físico-químicas, com um bom coeficiente de partição tanto em compartimentos hidrofóbicos quanto em hidrofílicos, amplo espectro de interação com os diferentes oxidantes produzidos no organismo, capacidade de interromper a cadeia de reações redox e de atuar de maneira reciclável na célula. Este composto paramagnético é considerado potente quanto à sua atividade protetora ao dano oxidativo induzido por alguns estados patológicos, especialmente nos quais há envolvimento de processos inflamatórios (CUZZOCREA et al., 2000; SAMUNI & BARENHOLZ, 2003; AUGUSTO et al., 2008; TSUHAKO et al., 2010; WILCOX, 2010).

Figura 6. Estruturas químicas do Tempol, onde se destaca o elétron desemparelhado centrado no oxigênio (Fig. 6. a.).



Fonte: Autor (ACD/Labs. Version 6.0).

A oxidação de proteínas e outras macromoléculas biológicas são um sério problema e estão relacionadas ao desenvolvimento de algumas doenças (Exemplo, catarata e doenças cardíacas). Como uma função de grande importância desempenhada pelo Tempol, estáveis nitróxidos, como o Tempol, têm sido apontados como ótimos candidatos à contenção dos danos oxidativos a proteínas e outras macromoléculas, por reagir bem com compostos de baixo peso molecular, com taxas de segunda ordem de 10^{-6} a $10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Alguns estudos têm mostrado os efeitos *in vivo* do Tempol e possíveis aplicações clínicas deste nitróxido (CUSCELA et al., 1996; SOULE et al., 2007; AUGUSTO et al., 2008; WILCOX, 2010).

2.3. Dependência do complexo NADPH oxidase para a formação das armadilhas extracelulares (ETs) e formação destas estruturas em resposta ao *M. tuberculosis*

Como descrito por Brinkmann et al. (2004), além da fagocitose, a produção de EROs/ERNs, de proteínas/péptidos antimicrobianos e degranulação, fagócitos liberam armadilhas extracelulares (ETs), denominadas armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) em neutrófilos. As armadilhas extracelulares são uma descoberta recente (2004) e, os aspectos moleculares que governam a estrutura e funcionalidade delas, estão cada vez mais sendo estudados e um crescente número de publicações reportam conflitantes dados sobre os aspectos moleculares adjacentes a sua formação, desprendimento para o espaço extracelular e possível ação antimicrobiana (KÖCKRITZ-BLICKWEDE et al., 2010; BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2012; GOLDMANN & MEDINA, 2013; RADIC & KAPLAN, 2013).

As armadilhas extracelulares têm sido implicadas na captura de diversos microrganismos no espaço extracelular, tais como vírus, bactérias, fungos e parasitas e além de responder a estes estímulos/microrganismos, também é capaz de responder a estímulos tais como partículas ou derivados microbianos (por exemplo, lipopolissacárido [LPS] ou N-formil-metionil-leucil-fenilalanina [fMLP], beta glucanos da parede fúngica), Hepoxilin A3 (DOUDA et al., 2015), a interleucinas (Exemplo IL-8), fibras amilóides (AZEVEDO et al., 2012) ou a agentes químicos como o oxigênio singlete e o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, um elemento *upstream* de NOX-2) que age diretamente sobre a via de PKC, levando a montagem do complexo NOX-2 e consequente formação de oxidantes (NISHINAKA et al., 2011; BYRD et al., 2013; GOLDMANN & MEDINA, 2013; RADIC & KAPLAN, 2013; STOIBER et al., 2015).

A retenção de microrganismos no espaço extracelular, através das ETs, pode propiciar uma resolução do foco infeccioso a nível local, evitando-se assim a disseminação do foco infeccioso. Embora este seja um assunto controverso (NAUSEEF, 2012), em alguns casos as armadilhas extracelulares podem matar patógenos, principalmente devido ao sua variada constituição, com a marcante presença de histonas (conhecidas como um dos mais potentes antimicrobianos já descobertos, MILLER et al., 1942; PARSEGHIAN & LUHRS, 2006; KAWASAKI & IWAMURO, 2008; POIRIER et al., 2014) e de proteínas com atividade antimicrobiana, como a lactoferrina, MPO, a proteína bactericida e indutora de permeabilidade (BPI, do inglês *bactericidal permeability-increasing protein*), catepsina G e lisozima.

Dentre as cepas de *M. tuberculosis*, a cepa avirulenta (H37Ra) é uma linhagem micobacteriana derivada da tradicional cepa H37, isolada de um paciente com TB em 1905, a qual também originou a cepa virulenta H37Rv (STEENKEN & GARDNER, 1946; ZHENG et al., 2008). Esta cepa apresenta características como a perda de virulência *in vivo*, menor capacidade de sobrevivência em condições anaeróbicas ou dentro de macrófagos, reduzida capacidade de disruptar fagossomos e características morfológicas distintas, como a perda da formação do fator corda (um fator de virulência do *M. tuberculosis*) (ZHENG et al., 2008).

Não há dados na literatura para a formação de ETs contra a cepa não virulenta do *M. tuberculosis* (H37Ra). Ramos et al. (2009) mostraram que NETs são formadas em resposta ao *M. tuberculosis* (H37Rv) e ao *M. canettii* e, que as armadilhas geradas em resposta as micobactérias, foram posteriormente capazes de matar *Listeria monocytogenes*, comprovando que NETs são incapazes de matar *M. tuberculosis* devido a características da micobactéria e não devido à natureza da sua constituição (que contém DNA [na forma de histonas] e proteínas com ação antimicrobiana), que a micobactéria induz. Assim, embora o DNA (histonas são potentes antimicrobianos) tenha sido reportado como o principal agente antimicrobiano das ETs (HALVERSON et al., 2015) e, estas armadilhas tenham sido descritas como capazes de matar alguns microrganismos (BRINKMANN et al., 2004; URBAN et al., 2006), estas armadilhas extracelulares não são capazes de matar o *M. tuberculosis*, apenas captura-lo.

Neste mesmo estudo, Ramos et al. (2009) sugeriram que, como os experimentos foram realizados com as micobactérias não-opsonizadas, poderia estar havendo o reconhecimento direto de estruturas (PAMPs) das micobactérias através do TLR-2/4 dos fagócitos. Estes PAMPs foram sugeridas por Ramos et al. (2009) por possivelmente ser algum componente da parede celular micobacteriana, tais como o lipoarabinomanano (LAM), lipomananas (LM),

fosfatidilinositol manosídeos (PIM2, PIM6) ou a lipoproteína de 19-kDa. Contudo, como será ainda aqui será observado, a lipoproteína de 19-kDa tem sido descartada como um possível indutor de ETs (BRAIAN et al., 2013).

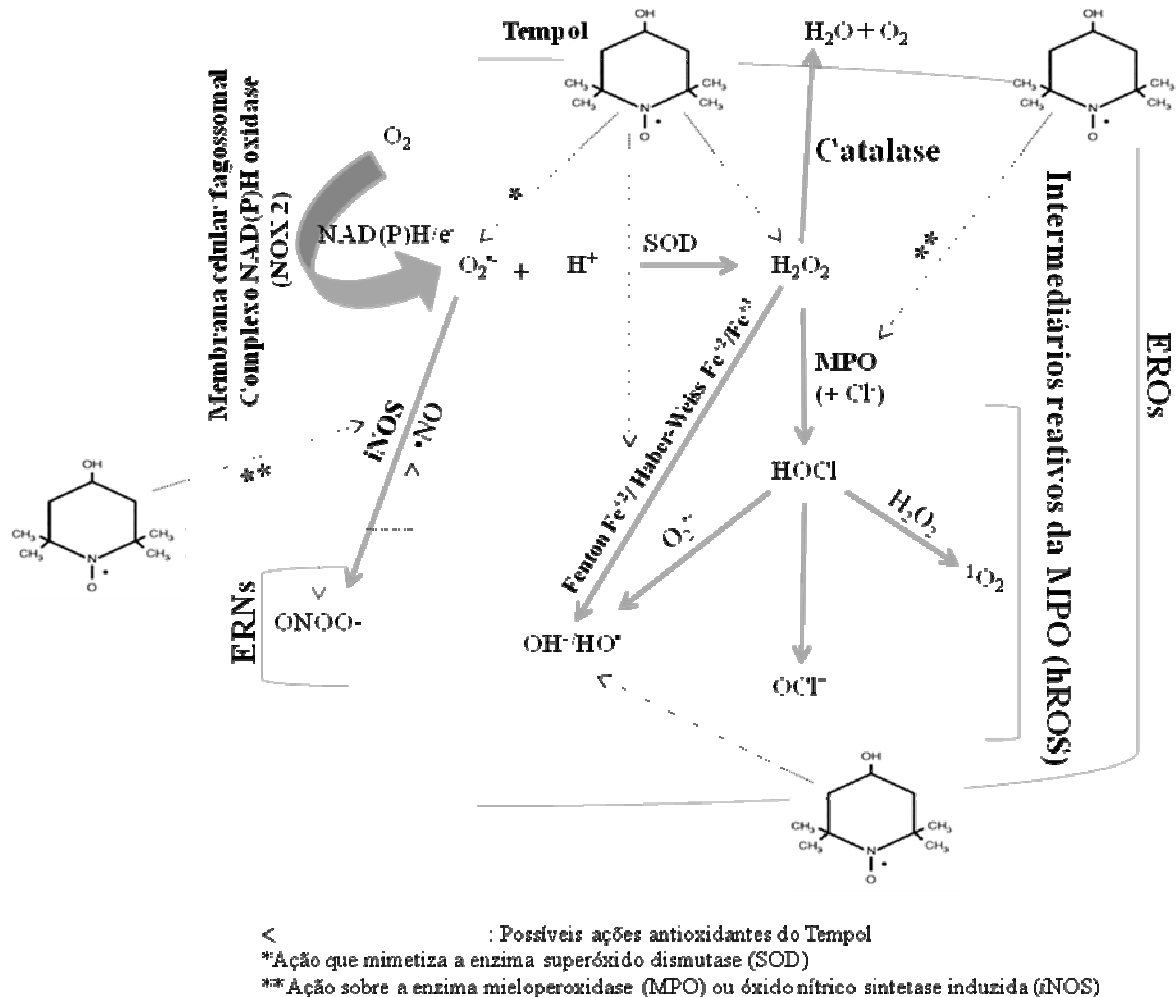
Segundo Hosseinzadeh et al. (2012), Tempol a uma concentração de 2000 μM foi usada para a inibição do *burst* oxidativo e de NETs contra *Candida albicans*. Além disso, o efeito da Vitamina-C e de flavonóides tem sido implicados na diminuição destas armadilhas extracelulares, segundo tais autores, pelas propriedades antioxidantes como um “*scavenger*” de EROs/ERNs (KIRCHNER et al., 2013; MOHAMMED et al., 2013), apesar dos também possíveis efeitos de flavonóides sobre mediadores *upstream* do complexo NADPH oxidase já terem sido descritos (CIZ et al., 2012).

Embora o Tempol possa interferir na resposta imune contra patógenos por diminuir a formação de oxidantes (**Fig. 7.**), isto seja uma situação indesejável, por outro lado, há situações em que realmente torna-se desejável reduzir o *burst* oxidativo por neutrófilos, devido ao pleiotropismo deste evento, que conduz a vários desfechos bioquímicos, como exemplo, na participação destas células em eventos/doenças cardiovasculares. Além disso, uma vez que o *burst* oxidativo gera diferentes oxidantes sinalizadores para a formação de armadilhas extracelulares, bem como outros mecanismos microbicidas, além dos próprios oxidantes que são microbicidas (**Fig. 8.**), o uso de Tempol durante a resposta microbicida ou durante a ativação de fagócitos por estímulos não microbianos que gerem estas armadilhas, poderia atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo ou por estas armadilhas extracelulares, cuja formação excessiva ou presença pode ter sérias consequências ao hospedeiro e têm sido implicadas em eventos patológicos como a trombose, doenças autoimunes (Exemplo, lúpus eritematoso sistêmico), doenças pulmonares, eventos inflamatórios intensos (Exemplo, artrite e gota [doença em que o urato tem sido implicado como um indutor de NETs, o que agrava o caso]) e câncer (COOPER et al., 2013; RADIC & KAPLAN, 2013; ZAWROTNIAK et al., 2013; ITAGAKI et al., 2015; GRABCANOVIC-MUSIJA et al., 2015; YILDIZ et al., 2015).

As possíveis vias de ativação de ETs são dependentes principalmente do estímulo (STOIBER et al., 2015) e, diferentes vias e componentes têm sido demonstradas em fagócitos humanos, tais como as envolvendo o receptor Toll-like 4/complexo NADPH oxidase, PAD4/ Ca^{+2} (necessita da mobilização intra e extracelulares de cálcio), óxido nítrico (NO), Raf-MEK-ERK/autofagia (neste caso, ativação de PKC por PMA e *upstream* da via Raf-MEK-ERK), “*high mobility group box 1*”, pentraxina 3, e a via que envolve os alvos da rapamicina nos mamíferos (“*mTOR-related pathways*”). Estas vias de sinalização intracelular

pode ou não requerer a prévia ativação do complexo NADPH oxidase (HAKKIM et al., 2011; REMIJSSEN et al., 2011; MCINTURFF et al., 2012; GRAY et al., 2013; KESHARI et al., 2013).

Figura 7. Representação esquemática da formação das espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) em fagócitos e possíveis ações do Tempol sobre estes oxidantes.



Legenda: NAD(P)H nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; EROs/ERNs: espécies reativas do oxigênio/nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; MPO: mieloperoxidase; SOD: superóxido dismutase; hROS: espécies altamente reativas do oxigênio (*highly reactive oxygen species*); $O_2^{\bullet -}$: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; HOCl: ácido hipocloroso; OCl⁻: anion hipoclorito; 1O_2 : oxigênio singlete; •NO: óxido nítrico; HO•: radical hidroxila; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. Pela ação da MPO fagocítica, são formadas as hROS.

Como mostrado na figura, Tempol pode apresentar uma vasta gama de atividade (multifuncional), atuando sobre os oxidantes: •OH, ONOO⁻, NO•, $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , bem como sobre as enzimas iNOS e MPO, responsáveis pela formação de potentes oxidantes. Além disso, este nitróxido pode aceitar o e⁻ proveniente do metal reduzido (Fe^{+2}) na reação de Fenton, portanto, evitando a formação de HO•/HO⁻ por inibir esta rota. (SOULE et al., 2007).

Observação: Neste esquema de representação esquemática, é apresentado uma extremamente simplificada visão geral, portanto, as reações químicas/interações não estão balanceadas.

Fonte: Autor

Como aqui já mencionado, tem sido descrito em grande parte da literatura a necessidade dos oxidantes gerados através do complexo NADPH oxidase para a formação de ETs (FUCHS et al., 2007; BIANCHI et al., 2009; NISHINAKA et al., 2011; RADA et al., 2013; RÖHM et al., 2014; STOIBER et al., 2015). Estes oxidantes tomam parte na sinalização para a translocação de elastase/MPO, bem como para outros eventos que auxiliam na formação destas armadilhas (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010). Na maioria dos casos, a formação de NETs tem sido reportada como dependente da prévia ativação do complexo NADPH oxidase e, conseqüente formação de ânions superóxidos, que dá origem a outros oxidantes (para induzir NETs, principalmente $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HOCl e 1O_2) que são implicados na translocação de MPO e elastase de grânulos primários no citoplasma até o núcleo da célula, facilitando a descondensação da cromatina e posterior formação da estrutura conhecida como armadilha extracelular (este processo é auxiliado por PAD-4, **Fig. 4.**). Além disso, Bianchi et al. (2009) conseguiram por terapia gênica, reconstituir a funcionalidade do complexo NADPH oxidase em fagócitos de pacientes com DGC e, desta forma, promover a formação de NETs na defesa contra *Aspergillus nidulans* (causador da aspergilose invasiva).

Entretanto, recentemente, um novo mecanismo para a formação de NET foi proposto, o qual, não envolve a dependência pelo complexo NADPH oxidase (PILSCZEK et al., 2010). Através deste mecanismo, as NETs são formadas em resposta ao *Staphylococcus aureus* de forma muito rápida, de cinco (5) até 10 min, em contraste com os tempos de até 3 horas quando envolve o complexo NADPH oxidase, a formação é mais pontual, o que permite a formação de vesículas e, o desprendimento das NETs dentro destas intactas vesículas para o espaço extracelular, onde elas são rompidas, liberando NETs lá, ocorrendo a já reportada capacidade destas armadilhas de capturar na armadilha (*trap*) e de matar (*Killing*) *S. aureus*. Tal mecanismo é considerado um processo que não traz alterações bruscas ao citoplasma e núcleo celular, portanto, não conduzindo a NETose, mecanismo que contrasta com os até então descritos que, devido ao padrão de ruptura nuclear e demanda citoplasmática (interação com citoesqueleto), conduz a morte celular (referida como NETose). No mesmo estudo, o *Panton–Valentine leukocidin*, uma toxina produzida por *S. aureus* que provoca lise de leucócitos, foi demonstrado como um potente indutor de NETs. Um mecanismo alternativo na resposta de fagócitos através do desprendimento de ETs em resposta a *C. albicans* também foi descrito (BYRD et al., 2013).

Demonstrando a complexidade que governa a formação das armadilhas extracelulares e as conseqüências biológicas destas estruturas *in vivo* e, levando-se em conta, à importância de estudos passados que hoje através de um link com estudos atuais trazem à tona todas as

faces das ETs, recentes estudos retratam a implicância destas estruturas em promover trombose e/ou doenças cardíacas, seja implicado a um processo infeccioso/inflamatório ou não (DELBOSC et al., 2011; RADIC & KAPLAN, 2013). Wong et al. (2013) observaram que embora ETs representem uma forma de defesa contra *M. tuberculosis*, o link com o estudo de Converse et al. (1996) pode indicar que uma resposta exacerbada destas estruturas contra as micobactérias pode resultar em trombose vascular. Assim, mais uma vez é aqui destacado o fato de que, se por um lado o Tempol pode enfraquecer a resposta immune contra patógenos, por outro lado, este antioxidante pode contribuir com a diminuição da formação das ETs em situações em que o excesso destas estruturas possa representar um risco à saúde, principalmente naquelas condições que envolvem os tecidos pulmonares (MEDINA, 2009; CHENG & PALANIYAR, 2013).

Neste mesmo sentido, embora um mecanismo para o *clearance* de ETs pareça envolver as proteínas surfactantes A, B e D (SP-A, SP-B e SP-D; SP: do inglês surfactant protein), de modo que para eliminar ETs elas se ligam ao DNA das ETs e facilitam a fagocitose destas estruturas por macrófagos alveolares, tenha sido descrito no pulmão (CHENG & PALANIYAR, 2013; ZAWROTNIAK et al., 2013), prévios trabalhos tem reportado que ETs formadas em grandes proporções e/ou quando a produção supera a capacidade depurativa destas estruturas, este excesso de ETs no tecido pulmonar pode dificultar a respiração através de obstruções e, assim sendo, elevar as taxas de mortalidade associadas a algumas condições clínicas, principalmente em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou em pacientes com fibrose cística (FC) infectados com *Pseudomonas aeruginosa* (YOUNG et al., 2011; CHENG & PALANIYAR, 2013; GRABCANOVIC-MUSIJA et al., 2015; MARCOS et al., 2015). No estudo de Marcos et al. (2015), os níveis de “*cell-free DNA*” (cfDNA), neste caso, provenientes das NETs, foram relacionados com o grau de obstrução do fluxo aéreo pulmonar. A presença em grandes quantidades de armadilhas extracelulares de eosinófilos também é um sério problema no curso da asma neutrofílica (grande quantidade de neutrófilos e eosinófilos no escarro) (CHENG & PALANIYAR, 2013).

Além disso, recentemente Röhm et al. (2014) demonstraram que o complexo NADPH oxidase está implicado na geração de oxidantes e conseqüentemente na ativação de NETs/NETose especificamente no pulmão, durante a pneumonia causada por *Aspergillus fumigatus*, de modo que a pneumonia foi observada tanto em camundongos tipo/selvagem e nos camundongos deficientes para o complexo NADPH oxidase (p47[phox-/-]), ao passo que a formação de NETs e conseqüente NETose não foi observada nos camundongos p47(phox-/-)

). O autor conclui que o complexo NADPH oxidase é essencial *in vivo* para a formação de NETs e resolução do foco infeccioso a nível local, aumentando a resposta microbicida contra o fungo. Ainda, foi demonstrado por Röhm et al. (2014) que o complexo NADPH oxidase aumenta também o número de neutrófilos que entram em apoptose, além da já referida NETose, dois processos bem distintos a que a população de neutrófilos pode submeter-se por uma modulação dual orientada pelo complexo NADPH oxidase, mas de qualquer forma, ambos contribuindo para o clearance de *Aspergillus fumigatus*.

Cabe aqui ser mencionado que, como será posteriormente discutido neste estudo, para a relação entre carga microbiana (multiplicidade de infecção, MOI) e intensidade do *burst* oxidativo e, como também observado por Repasy et al., (2013), o número de micobacterias intracelulares presentes em fagócitos, tais como os monócitos e neutrófilos, tem sido implicados na patogênese da tuberculose, uma vez que, quanto maior a carga bacilar, maior a resposta inflamatória local, evidenciado pelo número de fagócitos que entram em morte celular, pelo processo de necrose, apoptose e, como demonstrado mais recentemente, em NETose. Reforçando que, quanto maior a MOI, maior a intensidade da resposta via *burst* oxidativo a um determinado estímulo-patógeno específico e, isto pode ser o evento sinalizador para as diferentes formas de morte celular, como observado por Repasy et al., (2013), incluindo a NETose.

O desprendimento das NETs tem sido descrito como um evento coordenado e não regidos por padrões estocásticos, assim, dada a complexidade da intrincada rede que envolve o sistema imune, a regulação recíproca entre imunidade inata/adaptativa, bem como a regulação, às vezes oposta, entre as células Th1/Th2, sugerem que a ativação/inibição de NET ultrapassa limites da imunidade inata. Como exemplo, um incremento do padrão de resposta Th2, por hora definido como antagonista ao padrão Th1 frente a alguns patógenos (inclusive *M. tuberculosis*) pelo incremento de IL-7 tem sido reportado como um fator inibidor do *burst* oxidativo (assim como a inibição também por IL-4, IL-9 e IL-10), podendo isto desta forma também inibir o desprendimento de NETs, por um mecanismo de retroalimentação (FRY & MACKALL, 2002; PILETTE et al., 2002).

O *crosstalk* entre monócitos e neutrófilos durante a resposta imune ao *M. tuberculosis* envolvendo NETs tem sido bem estudado. Braian et al., 2013 observaram que neutrófilos estimulados com Mtb *in vitro* produzem NETs que se ligam a *heat shock protein 72* (Hsp72). Assim, quando macrófagos (MΦ) são cultivados com neutrófilos previamente estimulados por *M. tuberculosis*, neutrófilos são capazes de transferir o Hsp72, que é um sinal ligado a NET, para os MΦ, isto é capaz de recrutar e estimular tais células, também

reforçando a liberação de citocinas (IL-6, IL-1 β , IL-10 e TNF- α) por elas. Esta interação, durante o início da imunidade inata, provavelmente desempenha um importante papel, não apenas na imunomodulação da resposta ao *M. tuberculosis* por M Φ adjacentes, mas também durante a inflamação crônica que ocorre *in vivo* na TB, sendo importante para a regulação da autoimunidade. Persson et al. (2008) demonstraram que neutrófilos quando fagocitam *M. tuberculosis* liberam Hsp 72, mediando uma pró-inflamatória ativação de M Φ . Ou seja, capacidade de neutrófilos estimularem M Φ ao desprenderem NETs em resposta ao *M. tuberculosis*, é ao menos em parte, devido ao desprendimento concomitante de Hsp 72.

Adicionalmente, Hsp72 é uma proteína com alta atividade como chaperona e como citocina, portanto funcionando como um forte fator pró-inflamatório, estimulando monócitos via receptores TLR 2 e 4, que ativa a via do fator NF- κ B, resultando no desprendimento de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e NO. TNF- α aumenta a geração de oxidantes e o aumenta o *Killing* das micobactérias (BRAIAN et al., 2013).

Outra evidência apontada por Braian et al. (2013) é que, a formação das armadilhas extracelulares (ETs) precede a ETOse, eles provaram isto experimentalmente ao levar em conta o estudo de Persson et al. (2009), que demonstrou a importância de uma lipoproteína de 19-kDa em *M. tuberculosis* para induzir apoptose em neutrófilos, portanto em *M. tuberculosis* mutantes, falho para esta lipoproteína (lspA-/-), apoptose não ocorre, assim Braian e colaboradores demonstraram que *M. tuberculosis* (lspA-/-) induz NETs em neutrófilos normalmente, evidenciando que neste caso, apoptose não é necessária para a formação de ETs e, que, quando apoptose esta associada à formação destas estruturas, ela ocorre posteriormente as suas formações.

A descoberta de NETs é um evento recente no campo da Biologia e Medicina, assim, variados mecanismos e efeitos experimentados no corpo humano e reportados antes de 2004, hoje podem ser experimentalmente ligados de alguma forma a NETs, não se restringindo apenas ao sistema de defesa do organismo (EL HAFEZ, 2014). Por exemplo, o papel de NET pode também ser evidenciado em prévios trabalhos, que já reportavam sobre o papel de nucleotídeos na sinalização da promoção do *clearance* durante a apoptose e da resposta inflamatória (ELLIOTT et al., 2009). Outro link entre estados patológicos/doenças e ETs, é a antiga questão do cfDNA, que são fragmentos de DNA no soro/plasma, que há muito tempo atrás (precedendo a descoberta de ETs em 2004), são demonstrados em casos de estresse oxidativo intenso e, associados à morte celular. Neste caso, o estresse oxidativo pode previamente sinalizar via oxidantes para a formação de ETs, o que pode elevar localmente e, posteriormente, sistemicamente, a quantidade de DNA que não sofreu *clearence* local via

macrófagos, portanto, ganhando a corrente sanguínea. Sobre uma situação de estresse oxidativo intenso, parte da morte celular poderia também ser atribuída a ETOse e, não apenas, devido à necrose/apoptose (ERMAKOV et al., 2013; CHEN *et al.*, 2014). Como também demonstrado por Carswell et al. (1984), em 1984, antes do descobrimento das ETs, o DNA era um relatado componente presente no escarro de pacientes com FC, atualmente reconhecido como o DNA proveniente das NETs (MARCOS et al., 2015).

Do notório repertório de fatores de virulência e patogênicidade presentes no *M. tuberculosis*, a região de diferença 1 (RD1) está presente no genoma de cepas altamente virulentas de *M. tuberculosis*, cuja expressão codifica para o sistema de secreção do tipo VII (ESX), que é responsável pela secreção de proteínas, como a ESAT-6 (um dos maiores antígenos de células T presente no *M. tuberculosis*) ou CFP10. Este sistema permite a secreção de proteínas que constituem a principal interface entre a micobactéria e o hospedeiro (*i.e.*, a maioria são antígenos ou compostos altamente imunogênicos). Recentemente Francis et al. (2014) demonstraram que ESAT-6 (40 µg/mL) isoladamente propicia o aumento de Ca^{+2} e formação de NETs (Ca^{+2} intra e extracelular são necessários para a formação de ETs, como já discutido aqui), sendo, portanto, considerado um potente indutor das armadilhas extracelulares. Como os autores concluem e, como ainda será descrito aqui, esta função de ESAT-6 é interessante, uma vez que ela é capaz de induzir NETs e manter o processo inflamatório e necrótico necessário para a formação do granuloma e transmissão da TB (talvez isto se reflita em um processo evolutivo de propagação das micobacterias e perpetuação através de um equilíbrio de co-existência com o hospedeiro) ao mesmo tempo em que ESAT evita o *Killing* por fagócitos, em que o complexo CFP10:ESAT6 é capaz de inibir a trans-ativação do lipopolissacarídeo, que induz o fator NF-κB, regulando, assim, a produção de oxidantes para concentrações inferiores àquelas essenciais durante o *burst* oxidativo de fagócitos.

Mycobacterium bovis, cepa BCG (“*Bacille de Calmette et Guérin*”), é uma cepa que não apresenta a região genômica RDI (perda devido a uma deleção) que codifica para ESX, portanto, não secretando o fator de virulência ESAT-6, o que explica, em parte, a sua ausência de patogênicidade (FRIGUI et al., 2008). No entanto, *M. bovis* pode induzir uma efetiva resposta por fagócitos (NEUFERT et al., 2001).

Mycobacterium tuberculosis, cepa H37Ra, apesar da ausência de patogênicidade, apresenta algumas características imunogênicas, o que justifica seu uso em vacinas contra a TB, como a indução *in vivo* de $INF\gamma$ por células do hospedeiro em resposta a estimulação por H37Ra e, capacidade de induzir a fagocitose, o *burst* oxidativo e atividade microbicida por

macrófagos ou neutrófilos (PERSKVIST et al., 2000; NEUFERT et al., 2001). Quando estimulados por *M. tuberculosis* H37Ra, os neutrófilos acionam o complexo NADPH oxidase por um mecanismo dependente das proteínas tirosina quinase (PTKs, *upstream* ao complexo NADPH oxidase). O acionamento de PTKs leva a fosforilação de varias proteínas, uma das quais a fosfolipase Cg2 (PLCg2) e, posteriormente, acionamento da p38 MAPK (PERSKVIST et al., 2000). Além disso, uma lipoproteína de 19-kDa (um PAMP de *M. tuberculosis* H37Ra) tem sido descrita como um forte indutor para o *priming* e posterior efetiva ativação de neutrófilos frente às cepas H37Ra de *M. tuberculosis*, com indução do *burst* oxidativo e posterior ação microbicida por neutrófilos (NEUFERT et al., 2001). Entretanto, Braian et al. (2013) demonstraram a independência da lipoproteína de 19-kDa para que os neutrófilos produzam NETs, mas uma extrema necessidade para uma efetiva fagocitose das micobactérias para que ocorra a formação de NETs e posterior NETose, quando do caso (*i. e.*, tem sido descrito alguns pré-requisitos para que os neutrófilos façam NETose, como uma alta MOI ou um estímulo muito exagerado).

Apesar da expressão de ESAT-6 (embora em menor proporção comparada à cepa H37Rv, FRIGUI et al., 2013), a cepa H37Ra de *M. tuberculosis* não secreta tal proteína de forma eficiente *in vitro*, não devido à falta de ESX (desde que o sequenciamento do genoma de *M. tuberculosis* H37Ra demonstrou não haver deleção em RDI, FRIGUI et al., 2013; ZHENG et al., 2008), mas por mecanismos pós-regulatórios da secreção (envolvendo PhoP e EspA), o que já foi demonstrado também *in vivo*, desde que esta proteína, quando secretada, é especificamente reconhecida por células T do hospedeiro gerando uma subsequente resposta. Portanto, outros fatores da cepa H37Ra de *M. tuberculosis* podem estar de algum modo relacionado à indução de ETs. Uma vez que a cepa H37Ra de *M. tuberculosis* apresenta mutação no gene *phoP*, além da perda de controle sobre a secreção de ESAT-6 e seu parceiro CFP-10, que é feita por PhoP, consideráveis fatores de alta virulência encontrados na cepa virulenta (H37Rv), como os sulfolipídeos (SL), diaciltrealoses (DAT) e poliaciltrealoses (PAT) não são encontrados em *M. tuberculosis* H37Ra, desde que a ação de PhoP também é notória sobre a biossíntese destes lipídios conjugados (GONZALO-ASENSIO et al., 2008).

Embora também da rica constituição lipídica do *M. tuberculosis*, sérios candidatos possam surgir como possíveis fatores e/ou PAMPs atuando como estímulo para a formação das ETs, desde que estes compostos são conhecidos indutores do sistema imune, tais como os glicanos ou lipomananos que, inclusive, estes últimos são implicados na indução de apoptose em fagócitos (BRENNAN, 2003; DAO et al., 2004; MANTOVANI et al., 2011), é mais provável a participação de outros fatores de *M. tuberculosis* na indução de ETs, como os

carboidratos ou proteínas/lipoproteínas (como já provado para a proteína ESAT e outros exemplos mereçam destaque, como o antígeno apoptogênico e agonista de TLR2, desde que a via envolvendo TLR2 tem sido descrita por sinalizar para a formação de ETs) (KLEINNIJENHUIS et al., 2011; FORRELLAD et al., 2013), desde que estudos têm demonstrado que a inativação microbiana pelo calor ainda é capaz de induzir ETs, assim destaca-se a importância da termoestabilidade e/ou conservação de estruturas que possam se ligar aos fagócitos e, ativar rotas intracelulares de indução das ETs. Adicionalmente, segundo Kleinnijenhuis et al. (2011), fagócitos reconhecem carboidratos de *M. tuberculosis* e, isto, leva a ativação de vias intracelular envolvendo Raf1 e NF- κ B, portanto, talvez compartilhando semelhanças com a ativação de ETs.

Assim, o conhecimento do(s) PAMP(s) em *M. tuberculosis*, além do já conhecido indutor de NETs, ESAT-6, poderia propiciar novos conhecimentos sobre as vias de ativação das ETs por neutrófilos e macrófagos em resposta a este microrganismo, uma vez que, estas vias, incluindo as dependentes de EROs, respondem especificamente a um determinado indutor. Alguns PAMPs/estruturas têm sido descritas na literatura como potentes indutores de ETs, como o LPS, o fMLP, a piocianina (uma exotoxina considerada um fator de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*) (RADA et al., 2013), os fatores de virulência de *S. aureus* leucocidina Panton-Valentine e leucotoxina GH (PILSCZEK et al., 2010; MALACHOWA et al., 2013) e os beta glucanos da parede de *C. albicans* (BYRD et al., 2013) e, experimentos com estes estímulos isolados, tem demonstrado que eles geram ETs por vias diferentes, algumas delas independentes de EROs. Além dos efeitos não esperados de ETs no organismo, outro ponto a ser considerado como um sério problema surge quando os microrganismos lançam mão de fatores de virulência para degradar ETs ou escapar delas, como a hiperprodução de proteases (ARAZNA et al., 2013, HAHN et al., 2013), de DNAses (BEITER et al., 2006) ou a própria constituição intrínseca do microrganismo (como a presença de um alto conteúdo lipídico da parede celular de *M. tuberculosis*, HAHN et al., 2013).

Resumindo o possível papel do Tempol quanto à formação das ETs, embora NETs seja um importante mecanismo de defesa do organismo, vários efeitos patológicos surgem de um processo inflamatório exacerbado, devido a uma formação excessiva das ETs durante um mecanismo de defesa do hospedeiro exagerado (por exemplo, contra o *Streptococcus sp.* em uma bacteremia/endocardite) e/ou o quando o natural *clearance* destas armadilhas são ineficazes (Exemplo, na vasculite de pequenos vasos ou gerando o lúpus eritematoso sistêmico) (RADIC & KAPLAN, 2013). Portanto, por um lado, Tempol poderia diminuir a

resposta microbocida contra patógenos, mas por outro lado, ele também poderia diminuir a formação de ETs naquelas situações em que tal intervenção terapêutica fosse requerida.

2.4. *Mycobacterium tuberculosis* e a Tuberculose (TB)

Mycobacterium tuberculosis, ou bacilo de Koch, uma micobactéria primeiramente identificada por Robert Koch, em 1882, é a principal espécie pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do qual também fazem parte *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*, sendo o principal agente etiológico da tuberculose pulmonar (TB), considerada uma das maiores causas de morte por doenças infecciosas em todo mundo. Nos últimos anos, com a mundialmente emergência de linhagens multi-resistentes dos bacilos frente aos fármacos disponíveis (tuberculose resistente a múltiplas drogas [*multidrug resistant TB*, MDR-TB] e extensivamente resistente [*extensively drug-resistant TB* [XDR-TB])), a incidência de TB voltou a crescer e tornou-se um grave problema de saúde pública, carente de estratégias de controle, principalmente a produção de novos quimioterápicos antimicobacterianos (DYE et al., 1999; GANGULY et al., 2008; HERRERA-LEÓN et al., 2009; CDC, 2009; FORRELLAD et al., 2013).

A parede celular do *M. tuberculosis* apresenta predominância de lipídeos (envelope celular com predominância de ácidos micólicos) frente a outros constituintes, como os peptidoglicanos e arabinogalactanos, com produção de estruturas únicas, chamada de parede celular de quimiotipo IV, alvo de diferentes drogas, devido à alta biossíntese de ácidos micólicos e sua importância como componente da parede celular micobacteriana, além de conferir resistência à coloração álcool ácida. Lipídeos fracamente ligados ou livres, como o 6,6 dimicolil-trealose, conhecido como fator corda (FC), que juntamente com a cera D, são importantes fatores de virulência contribuindo significativamente para a patogênese da micobactéria. *Mycobacterium tuberculosis* é um aeróbio restrito, de lento crescimento e patógeno intracelular facultativo que coloniza preferencialmente as cavidades pulmonares, onde a pressão de oxigênio é alta, sendo o homem seu único reservatório. A morfologia celular típica do microrganismo, observada em colorações para bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), são de bacilos delgados, ligeiramente curvos, imóveis, de coloração vermelha intensa, com aspecto distinto em rosário. Em meio Löwenstein-Jensen ou Middlebrook apresenta-se como colônias não pigmentadas, rugosas e de cor camurça,

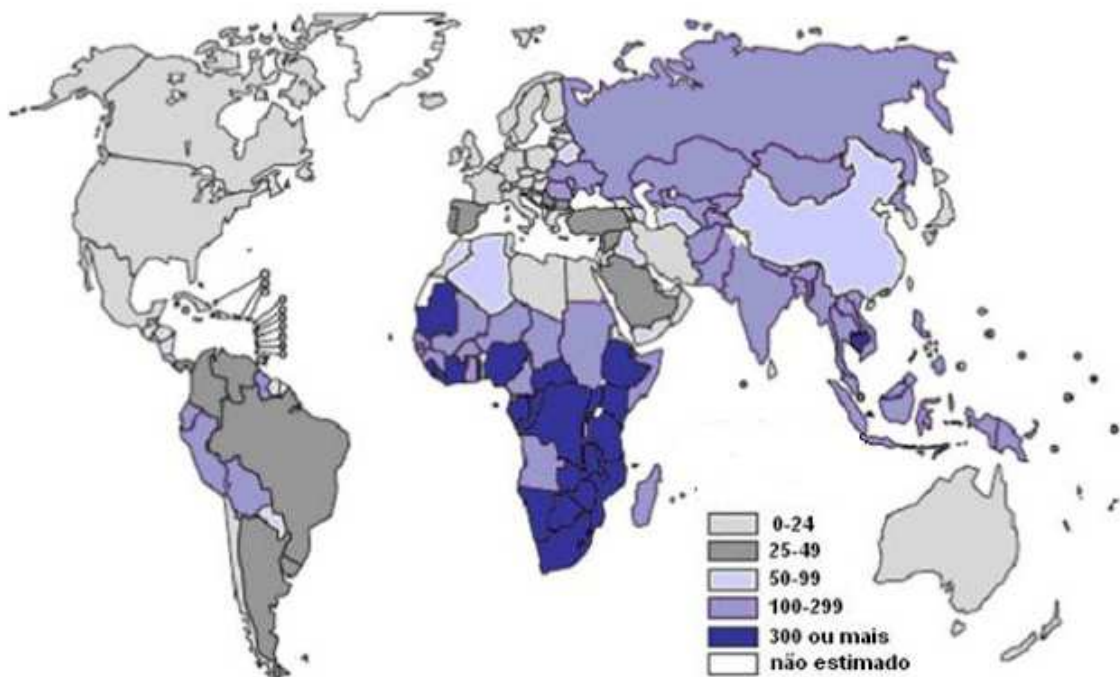
podendo ocorrer o cordão serpentiforme devido à produção do FC (KONEMAN et al., 2008; NEYROLLES & GUILHOT, 2011).

Mycobacterium tuberculosis é também responsável pelas chamadas tuberculose extrapulmonares, originadas por disseminação hematogênica a partir de um foco pulmonar primário, podendo afetar diversas partes do organismo, tais como, laringe, ossos, sistema gênito-urinário, trato gastrointestinal, sistema nervoso (meningite tuberculosa), sistema tegumentar (lúpus vulgar), sistema linfático, além do próprio sistema hematológico com possibilidade de ocorrer à forma vascular disseminada da infecção e sepse, sendo que a possibilidade de ocorrência destas condições estão associadas aos fatores de defesa do hospedeiro bem como do padrão de virulência/patogenicidade das diferentes cepas de *M. tuberculosis* (ALFANDARI, et al., 1995; GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2007; KONEMAN et al., 2008).

O controle da TB, que se supunha que ocorreria por volta do fim do século XX, claramente já teve sua data adiada, sendo que em 1993 a OMS a declarou uma emergência mundial, embora controlados momentaneamente, os casos de TB teve novamente um incremento significativo no século XXI. A tuberculose resistente a múltiplas drogas (MDR-TB) é definida como a resistência das micobactérias à rifampicina e à isoniazida, e o aumento em sua incidência tem sido publicado mundialmente. Muitos fatores têm contribuído para o recrudescimento e disseminação da TB, podendo-se destacar o fato da TB ser uma doença altamente contagiosa e com transmissão aerógena, além de desigualdade social, presença de aglomerados populacionais, os movimentos migratórios, o envelhecimento da população e a epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LONNROTH et al., 2009). Como há poucos fármacos efetivos disponíveis, a MDR-TB pode levar a uma doença potencialmente intratável, com possibilidade do número de portadores da doença aumentar exponencialmente. Esta ameaça não deve ser negligenciada na busca e conquista efetiva de novos fármacos antimicobacterianos, para superar a MDR-TB, principalmente por se tratar de uma doença que atinge majoritariamente países subdesenvolvidos, cujos afetados apresentam baixo poder aquisitivo, com carência de terapias com menor custo. Estes dados reforçam uma perspectiva assustadora, pois, a MDR-TB, com a emergência da AIDS e, aumento de infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), prenunciam-se como as principais endemias urbanas da atualidade, com a possibilidade de conversão da endemia de “tratável” em “intratável”, assim como antes de 1944 (MARCH, 1996; GLAISSBERG, 1999; SOUZA & VASCONCELOS, 2005; PEDROSO & ROCHA, 2009).

A TB é uma doença infecto-contagiosa, declarada na atualidade como um grave problema de saúde pública em todo mundo, em especial, nos países subdesenvolvidos (**Fig. 9.**), estimando-se em um terço a população mundial infectada com *M. tuberculosis*, estando sob o risco de desenvolver a doença, com aproximadamente oito milhões de casos novos e quase três milhões de mortes anualmente (DYE & WILLIAMS, 2010; CRESWELL et al., 2014). No Brasil, a redução da magnitude da TB nunca foi significativa, representando um sério impacto no País, sendo uma doença de prioridade nacional, uma vez que juntamente com outros 21 países em desenvolvimento, albergam 80% dos casos mundiais da doença. Estima-se que 50 milhões de brasileiros estejam infectados por *M. tuberculosis*, aproximadamente 80.000 casos novos com cerca de 4 a 5 mil mortes anualmente, cuja associação da doença com a AIDS tem contribuído consideravelmente com a alta mortalidade. A projeção de novas infecções adquiridas entre 2002 e 2020 foi estimada em um bilhão de pessoas; desses, 150 milhões deverão adoecer e 36 milhões morrer de tuberculose (BRASIL, 2009). A estimativa de TB para 2013 no Brasil foi de 83.000 casos novos mantendo a incidência de aproximadamente 42 casos anualmente para cada 100.000 habitantes (WHO, 2012; BRASIL, 2013).

Figura 9. Estimativa por país para os novos casos de Tuberculose para cada 100.000 pessoas.



Adaptado de: WHO report, 2013.

Dentre o um terço da população mundial que estão latentemente infectados com o *M. tuberculosis*, cerca de 5 a 10 % irão desenvolver a doença TB ao longo da vida. Isto se deve a uma possível imunodeficiência que possa vir a ocorrer com os pacientes infectados, levando a manifestação das micobactérias que são normalmente contidas pelo sistema imune competente de pacientes saudáveis. Contudo, estudos clínicos mostram que o desfecho TB parece ser mais comum em pacientes infectados em que exista uma comorbidade, sendo que, frequentemente, diabetes ou HIV/AIDS são as principais doenças/condição que predispõem pacientes infectados a desenvolverem TB, elevando-se assim o risco para o desfecho TB nestes grupos de infectados (AHAMAD, 2011; CHOI et al., 2013).

Um dos principais determinantes quanto à manifestação da tuberculose em pacientes infectados pelo *M. tuberculosis* são os fatores do hospedeiro que estão relacionados ao sistema imunológico, assim destaca-se o envolvimento dos oxidantes. Fatores de virulência de *M. tuberculosis* estão relacionados à sua resistência à defesa do hospedeiro. As proteínas CFP-10, ESAT-6 (já discutido aqui, como um indutor de NETs) e o complexo CFP10:ESAT6 são capazes de inibir a trans-ativação do lipopolissacarídeo, que induz o fator NF- κ B, regulando, assim, a produção de oxidantes para concentrações inferiores àquelas essenciais durante o *burst* respiratório de fagócitos, comprometendo a resposta destas células (GANGULY et al., 2008). Isto explica em parte, a capacidade das micobactérias virulentas (como exemplo, a cepa padrão H37Rv) de sobreviverem dentro de fagócitos (devido ao *M. tuberculosis* evitar a acidificação do fagossomo, com a expressão da proteína quinase G [PknG], que posteriormente evita a fusão dos fagossomos com os lisossomos), fato este não observado para a cepa avirulenta do *M. tuberculosis* (H37Ra) que, devido à plasticidade de seu genoma, com grandes transposições/inserções e/ou mutações pontuais (SNPs) em sequências de DNA essenciais para a formação de proteínas chaves, apresenta limitado repertório para o processo de colonização do hospedeiro, virulência e patogenicidade (RINDI et al., 1999; LARI et al., 2001; ZHENG et al., 2008).

Desde o sequenciamento completo do genoma de *M. tuberculosis*, em 1998 (cepa H37Rv (GenBank, acesso no. NC_000962) e em 2002 (com a comparação entre o genoma de isolados clínicos CDC1551 [GenBank, acesso no. AE000516] e a cepa H37Rv), diversos mecanismos de resistência, elucidamento de alvos de fármacos em uso e, até mesmo, novos alvos terapêuticos, têm sido propostos, inclusive evidenciando um diversificado padrão genético entre os isolados clínicos e a cepa padrão H37Rv, refletindo nas características dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, presença de alvos farmacológicos, patogenicidade e diversificados mecanismos de virulência de *M. tuberculosis*. Demonstrando

a marcante constituição de *M. tuberculosis*, a maior parte das moléculas testadas, exploram suas propriedades hidrofóbicas, devido ao grande número de enzimas relacionadas ao metabolismo dos lipídeos em *M. tuberculosis*, reveladas pelo sequenciamento de seu genoma que evidenciou uma alta densidade gênica relacionados as sínteses de mais de 250 enzimas da biossíntese de lipídeos, comparadas com 50 em *E. coli*, destacando a importância da constituição lipídica de *M. tuberculosis* (COLE et al., 1998; FLEISCHMANN et al., 2002).

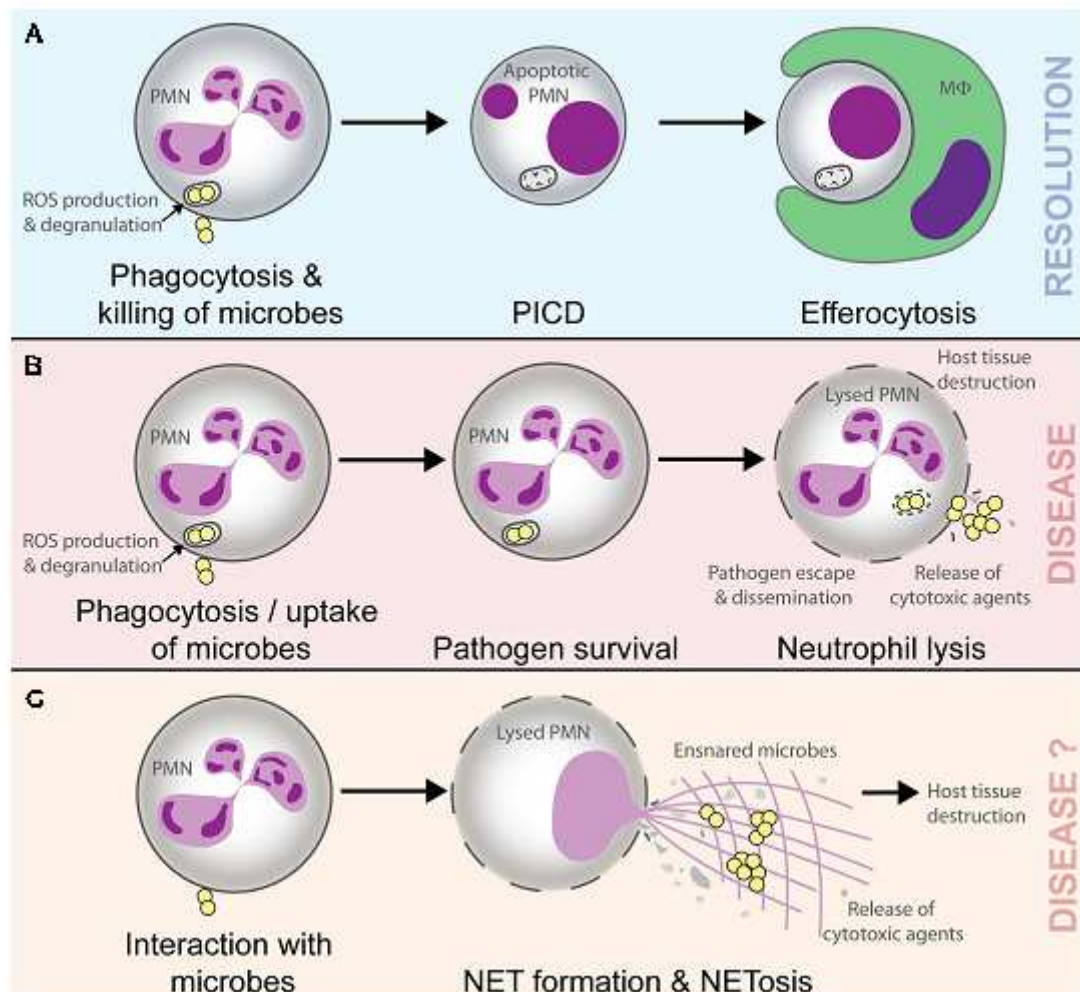
Embora o *M. tuberculosis* possa se comportar como um importante patógeno intracelular, nos últimos anos, o papel da matriz extracelular tem recebido notório destaque na patogênese de algumas doenças pulmonares, inclusive na TB, tendo sido evidenciado o papel de EROs/ERNs no espaço extracelular e, os possíveis papéis destes oxidantes neste ambiente (BARGAGLI et al., 2009; ELKINGTON et al., 2011).

O macrófago constitui a principal célula de defesa frente o *M. tuberculosis*, dispondo de uma variedade de resposta microbicidas, dentre estas, as que ocorrem de forma sequencial, envolvendo a fagocitose, produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, a maturação do fagossomo em fagolisossomo (*i.e.*, com prévia acidificação do meio e, posteriormente, morte das micobactérias nos fagolisossomos, por ação das enzimas hidrolíticas do lisossomo), a posterior produção de citocinas e a apresentação de antígenos (HESTIVIC et al., 2005). Em geral, uma resposta imune mediada por células desenvolve-se até 8 dias após a infecção com o *M. tuberculosis*, macrófagos, linfócitos T e outras células imune ativadas formam granulomas circundando os nichos infecciosos e impedindo sua disseminação. Se a resposta adaptativa for do tipo Th-1, uma ação efetiva ocorrerá para a eliminação das micobactérias e os granulomas sofrerem cura por fibrose e calcificação, neste caso a doença não progride. Quando o padrão de resposta adaptativo Th-2 é superior ao Th-1 os granulomas sofrem necrose, os bacilos se disseminam e o curso infeccioso progride (AHMAD, 2011).

A efetividade e importância da resposta de oxidantes de nitrogênio ao *M. tuberculosis* foi demonstrada no estudo de Singh et al. (2008). Em experimentos realizados *in vitro*, a adição de substâncias sintéticas (diferentes derivados de Nitro-Imidazóis bicíclicos) reforçou o desprendimento de diferentes ERN, incluindo $\bullet\text{NO}$, tendo como desfecho a morte de *M. tuberculosis* em condições anaeróbicas. Adicionalmente, a utilização em um grupo controle de agentes sequestradores de $\bullet\text{NO}$ protegeu os bacilos da morte anaeróbica por doses letais dos derivados nitro-imidazólicos. Assim, sugere-se um possível efeito sinérgico na atuação destes compostos *in vivo* com os mecanismos intrínsecos da resposta imune inata intermediada por oxidantes contra o *M. tuberculosis*.

Em humanos, os neutrófilos tem uma meia vida de aproximadamente 6,6 horas, o que resulta em um *turnover* de aproximadamente 10^9 cells/kg/dia. Contudo, em processos inflamatórios, a vida média de um neutrófilo pode aumentar em até varias vezes (STEPHAN & FABRI, 2015). Recentemente foi demonstrado que a vida útil dos neutrófilos pode atingir até dois (2) dias (LU et al., 2012). Quanto à função, diferentes desfechos podem ocorrer na resposta imune mediada por neutrófilos (**Fig. 10.**).

Figura 10. Possíveis desfechos da ação de neutrófilos frente a patógenos

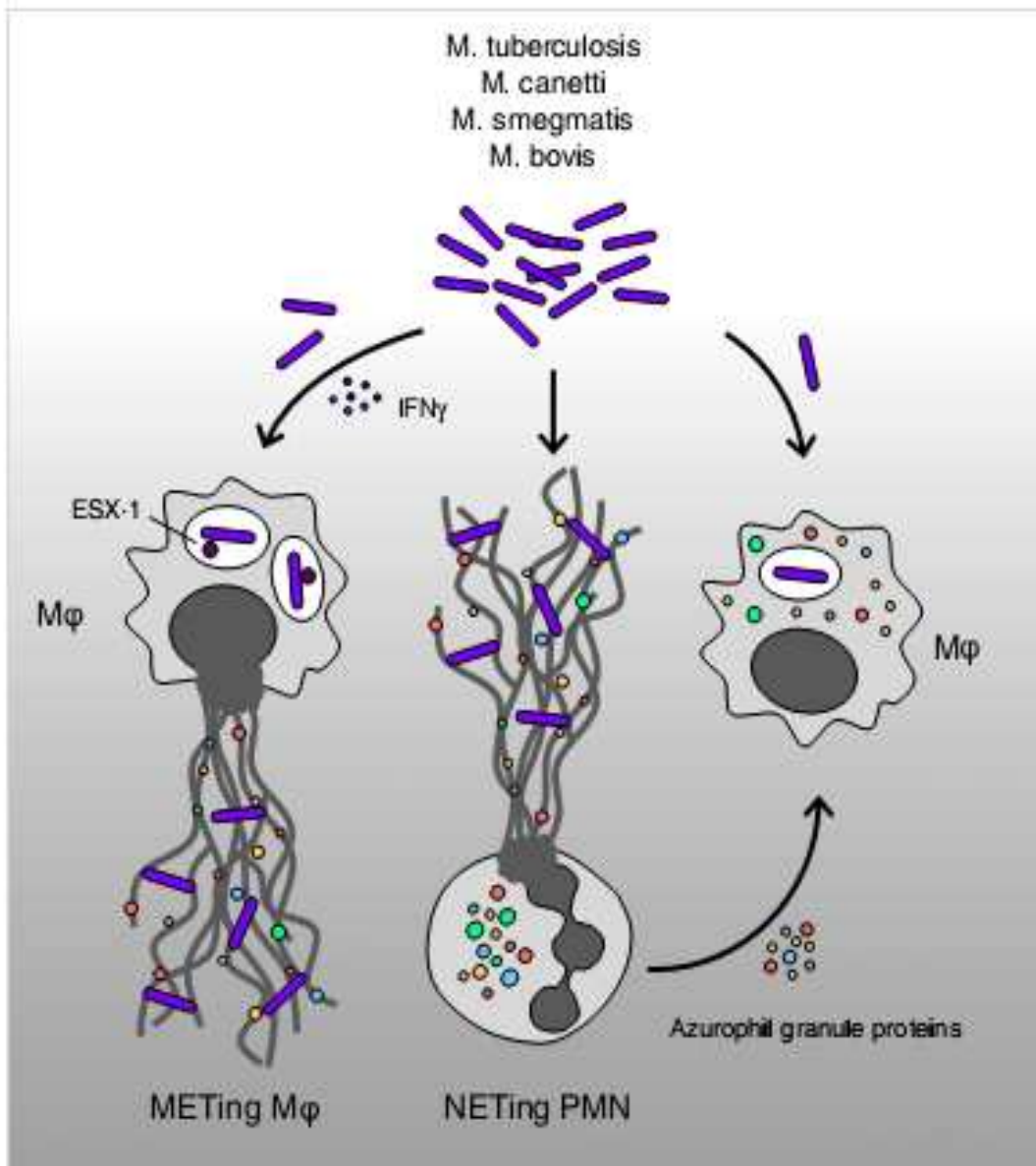


Legenda: A. A fagocitose e *Killing* de microrganismos por neutrófilos reforçam a apoptose e posterior remoção por macrófagos (MΦ). Este processo promove a resolução do foco/resposta infeccioso/ inflamatória. B. fatores de virulência do microrganismo pode causar lise dos neutrófilos, facilitando a disseminação do patógeno e liberação de moléculas citotóxicas que geram dano tecidual; C. NETs capturam e, em alguns casos, matam patógenos, mas isto pode resultar no desprendimento de citocinas que geram dano tecidual e/ou um extensivo dano inflamatório, neste caso, a formação de NET e posterior NETose, quando do caso, pode levar ao desfecho doença.

Adaptado de Lu et al. (2012).

Embora macrófagos sejam as células efetoras na defesa imunológica ao *M. tuberculosis*, nos últimos tempos foi claramente estabelecida a importância da ação de neutrófilos nos primeiros momentos de infecção, bem como a grande participação destas células na formação dos granulomas encontrados na TB ativa (MANTOVANI et al., 2011; FRANCIS et al.; 2014). Braian et al. (2013) mostraram que a produção de NETs por neutrófilos frente a este microrganismo é determinante para a ativação de macrófagos (**Fig. 11**). Neste mesmo trabalho, foi explicitado que a produção de EROs por neutrófilos é um evento essencial para a formação de NETs. Assim é destacado a importância da interação entre monócitos/macrófagos e neutrófilos durante a infecção por *M. tuberculosis* e, o *cross-talk* entre estas células durante a resposta imune inata e, também, com outros componentes do sistema imune, inclusive, da resposta imune adaptativa contra as micobactérias (BRAIAN et al., 2013; FRANCIS et al., 2014). Além disso, tem sido demonstrado que neutrófilos que fagocitam micobactérias, sofrendo ou não apoptose ou NETose tendem a liberar diferentes fatores que amplificam a resposta imune e também contribuem na transição entre a resposta imune inata e adquirida (ERUSLANOV et al., 2005; POKKALI et al., 2009).

Figura 11. Interação entre macrófagos e neutrófilos durante a formação de armadilhas extracelulares por estes fagócitos em resposta ao *Mycobacterium tuberculosis* ou contra outras micobactérias.



Legenda: Em resposta as micobactérias, os grânulos primários (azurófilos) produzidos por neutrófilos e as armadilhas extracelular de neutrófilos (*Neutrophils extracellular traps* - NETs, portando sinais como a presença de Hsp72 [*'danger signal'*], não mostrados na figura) são capazes de estimular os macrófagos para gerar armadilhas extracelular de macrófagos/monócitos (METs). Contudo, uma alta MOI, o Interferon gama (IFN γ) gerados por células de defesa e o sistema ESX-1 de *M. tuberculosis* são essenciais para ativar os macrófagos e em seguida permitir que estas células façam METs.

Fonte: Braian et al., (2013); Hahn et al. (2013); Wong & Jacobs Jr, (2013)

Assim, analisando em conjunto a resposta oxidativa de fagócitos e o uso de antioxidantes, levanta-se um ponto crucial, que permanece não esclarecido: se o uso de antioxidantes altera a resposta de neutrófilos frente a *M. tuberculosis*.

3. OBJETIVOS

O objetivo central deste estudo foi avaliar a ação do antioxidante Tempol sobre a resposta microbicida de neutrófilos humanos contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Especificamente, foi avaliado:

- (i) A ativação do sistema NOX2 de neutrófilos humanos expostos ao *M. tuberculosis*;
- (ii) A capacidade microbicida de neutrófilos humanos sobre *M. tuberculosis*;
- (iii) A ação do antioxidante Tempol sobre o sistema NOX2 de neutrófilos humanos expostos a *M. tuberculosis* e seus possíveis efeitos sobre a capacidade microbicida destas células.

4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

4.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes, bem como todos os materiais utilizados neste estudo, foram esterilizados em autoclave ou por filtração em filtros Millipore (Millipore Corporation, hydrophilic Durapore[®] PVDF, 0.22 µm, Ø 47 mm), quando necessário. N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP, Sigma Life Science); Diphenyleneiodonium chloride (DPI, Sigma); Superóxido dismutase (SOD, from bovine erythrocytes, Sigma-Aldrich); 3-Aminophthalhydrazide (luminol 97 %, Sigma-Aldrich); Dextran from *Leuconostoc* spp (Fluka-Sigma); Thapsigargin (≥98 % HPLC, Sigma); 4-Aminophthalhydrazide (Isoluminol 97 %, Sigma-Aldrich); 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT Ultrapure, USB Corp., Cleveland, OH); D-glucose (Vetec fina); Cytochrome *c* (from equine heart, Sigma-Aldrich); Horseradish peroxidase (Sigma); Ester phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma); Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare); Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640 without phenol red, Sigma); Bovine serum albumin (BSA, Sigma); Leishman's stain (Sigma); Triton-X-100 1 % (Invitrogen); 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (4-Hydroxy-Tempo ou Tempol 97 %, Sigma-Aldrich) foi diluído em água deionizada (purificada através de um sistema Milli-Q). Meios de cultivo microbiano: Agar/Caldo (7H10/7H9) *Middlebrook* (HiMedia Laboratories); Suplemento de crescimento Middlebrook OADC (Albumina bovina fração V: 2,50 g Dextrose: 1,00 g Catalase: 0,002 g Ácido oléico: 0,025 g Cloreto de sódio: 0.425 g Água destilada: 50.00 mL, HiMedia Laboratories). Os solventes DMSO (Neon Comercial) e Álcool metílico (Êxodo científica) utilizados nestes experimentos foram de grau analítico. H₂O pH 11 foi preparada através da adição de NaOH (1 mM) a água deionizada. Tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4): NaCl (120 mM), KH₂PO₄ (1,7 mM), Na₂HPO₄ (8,3 mM) e KCl (5 mM).

4.2. Cultivo do *Mycobacterium tuberculosis* e preparo do estímulo

As cepas do *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 35177) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) e cultivadas em meio Löwenstein Jensen (MLJ) e mantidas em garrafas de cultura celular, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas da UNIFAL-MG, sob a supervisão do Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco. Para obtenção dos inóculos utilizados na realização do *burst* oxidativo e *Killing*, *M. tuberculosis* foi cultivado por 21 dias a 37 °C em caldo *Middlebrook* 7H9 (acrescido de Tween 80 [0,05 %], peptona [0,5 %], glicerol [0,5 %] e o suplemento OADC [48 mL por litro de meio]). A seguir, 10 mL deste cultivo foram centrifugados a força centrífuga relativa (unidade x g) de 2200 por 8 minutos e o *pellet* ressuscitado em PBS (pH 7,4). Por espectrofotometria, o inóculo foi padronizado em Unidade formadora de Colônia (UFC) por mL ($OD_{600}=0,05$ =aproximadamente 5×10^6 CFU/mL). Por último, *M. tuberculosis* foi inativado pelo calor por 30 minutos a 80 °C apenas para alguns experimentos da avaliação do *burst* oxidativo, sendo que para o ensaio de *Killing*, foi utilizado o *M. tuberculosis* viável. A opsonização foi realizada por incubação a 37 °C durante uma hora do *M. tuberculosis* com soro humano homólogo (20 %), sendo em seguida centrifugado a 700 x g por 10 minutos. O *pellet* formado foi ressuscitado em PBS.

4.3. Obtenção dos neutrófilos

Declaração de ética

Estudos *ex vivo* foram realizados com neutrófilos humanos isolados de sangue total por gradiente de densidade, obtidos a partir da coleta de sangue venoso. Este estudo foi conduzido de acordo com a resolução CNS 466/12 (BRASIL, 2012), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFAL-MG (protocolo de aprovação: CAAE 17064713.0.0000.5142, **ANEXO A**). Os voluntários doadores do sangue venoso foram convidados a participar e foram escolhidos entre indivíduos saudáveis, do sexo masculino, na faixa etária de 20-38 anos, que não fizeram uso de antibióticos e/ou anti-inflamatórios nos últimos sete dias que antecederem as coletas de sangue, bem como voluntários que relataram a não ocorrência de prévia doença infecciosa (principalmente por *M. tuberculosis*) próxima à data de coleta (últimos sete dias). As coletas de sangue foram realizadas em condições

apropriadas de assepsia, após esclarecimentos dos propósitos do trabalho e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, **APÊNDICE A**) pelos voluntários.

Isolamento dos neutrófilos

O isolamento dos neutrófilos foi realizado conforme metodologia descrita por Nauseef (2007) com algumas alterações propostas por Magbool et al. (2011). O sangue total coletado em tubos com heparina (aproximadamente 40 mL) foi diluído 1:1 em PBS, em seguida, transferido suavemente para tubos Falcon contendo Ficoll e, posteriormente, centrifugados a 2000 x g por 15 minutos. Assim, três camadas foram observadas, sendo que após a eliminação da camada de plaquetas/plasma (ao topo), do anel de mononucleares e do remanescente de Ficoll, os neutrófilos presentes no *pellet* foram ressuspensos em PBS e tratados com dextrana (4 %), com os tubos tendo sido mantidos inclinados em banho de gelo para sedimentação das hemácias por 45 min. A seguir, o sobrenadante obtido, correspondendo aos neutrófilos, foi coletado, completado com PBS e, centrifugados a 600 x g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* tratado com água Milli-Q gelada para lise das hemácias, após isto, NaCl 2,7 % foi adicionado aos neutrófilos para restabelecer a isotonicidade, sendo que, de acordo com Itakura & McCarty (2013), o KCl proveniente deste tampão é essencial para se atingir tal objetivo. O remanescente celular foi completado com a adição de NaCl 0,9 %, nova centrifugação foi realizada a 400 x g por 10 minutos e o *pellet* obtido, que corresponde aos polimorfonucleares, foram ressuspensos em 2 mL de PBS desprovido de glicose, CaCl₂ e MgCl₂ e mantidos em temperatura adequada até a realização dos experimentos. Análise de viabilidade pelo método de exclusão com *Trypan blue* foi performada, tendo sido considerado um valor de viabilidade igual ou maior a 92 % como satisfatório. Coloração da lâmina foi realizada, em que, um grau de pureza dos neutrófilos de 94 % dentre as células polimorfonucleares foi considerado. Por último, contagem dos neutrófilos em hemocítmetro foi realizada, e a quantidade de células por mL foi ajustado para 10⁶/mL.

4.4. Mensuração da atividade do sistema NOX2 dos neutrófilos

Para avaliar a capacidade dos neutrófilos, tratados ou não com o Tempol, de produzirem oxidantes contra *M. tuberculosis*, neste trabalho, foram utilizadas as metodologias de redução do ferrocitocromo *c* (550 nm) inibida por SOD, para quantificar especificamente o

$O_2^{\bullet-}$ extracelular liberado pelo sistema NOX2 e, o ensaio de quimioluminescência amplificada, que avalia os EROs/ERNs total (intracelular e extracelular) com o uso do Luminol e, EROs extracelular, quando isoluminol é usado. Na avaliação da produção de oxidantes, para o controle de inibição do *burst* oxidativo, os neutrófilos foram incubados por 10 min com o inibidor de NOX2, o DPI (30 μM). Nos grupos tratados, os neutrófilos foram pré-tratados também por 10 min com o Tempol (450 μM). Como um estímulo para a ativação do *burst* oxidativo foram utilizados *M. tuberculosis* (em alguns experimentos inativado pelo calor) opsonizados ou não com soro (a multiplicidade de infecção [MOI] variando de 1 a 100) ou fMLP (40 μM) ou PMA (10 nM) ou Tapsigargina (4 μM). Antes da realização do *burst* oxidativo com o Tempol a uma concentração de 450 μM nas condições experimentais aqui descritas, foi realizada uma triagem (dados não mostrados) para avaliar a concentração efetiva do Tempol que reduziu a absorbância dos grupos tratados em 50 % comparados ao grupo controle (EC_{50}), através do teste com o ferrocitocromo *c*, portanto, avaliando a influência do Tempol especificamente sobre a diminuição do $O_2^{\bullet-}$ extracelular. A EC_{50} foi obtida através de regressão linear, com os tratamentos com Tempol nos grupos estimulados com *M. tuberculosis* (MOI 10) tendo sido feitos com concentrações que variaram de 0,7 a 700 μM . A EC_{50} obtida, 450 μM foi utilizada em todos os experimentos, exceto quando especificado de outra forma.

Quantificação das EROs/ERNs totais

Para o ensaio de quimioluminescência amplificada, em tubos Eppendorf de 1,5 mL, neutrófilos (10^6 células/mL) foram incubados na presença ou ausência de DPI (32 μM) ou Tempol (450 μM) por 10 min. A seguir, foram adicionados glicose (10 mM), $CaCl_2$ (1 mM), $MgCl_2$ (1,5 mM), Luminol (50 μM) ou Isoluminol (50 μM , neste caso, com adição de horseradish peroxidase [HRP, 8U/mL]). Na sequência, foi adicionado o estímulo: *M. tuberculosis* (MOI de 10) ou fMLP (40 μM). As leituras foram realizadas em um luminômetro GloMax™ 20/20 (Promega) durante 60 minutos e os resultados reportados como unidade relativa de luz (URL) geradas neste intervalo de tempo (DAHLGREN et al., 2007).

Quantificação de $O_2^{\bullet-}$ extracelular

No teste com o citocromo *c*, após a adição dos neutrófilos (10^6 células/mL) em poços de uma microplaca de 96 poços recobertos com BSA (1 % em PBS), foi realizado um prévio

tratamento das células por 10 min com o DPI (32 μM), SOD (50 U/mL) ou com o Tempol (450 μM). A seguir, glicose (10 mM), $CaCl_2$ (1 mM) e $MgCl_2$ (1,5 mM) foram adicionados aos poços para propiciar ideal ativação do *burst* oxidativo. Após isto, os poços foram acrescidos de citocromo *c* (25 μM). Por último, foram adicionados os estímulos: *M. tuberculosis* (em alguns casos opsonizadas, MOI variando de 1 a 100) ou fMLP (40 μM), ou PMA (100 nM) ou Tapsigargina (4 μM). A microplaca foi então incubada a 37 °C por três horas e as leituras foram feitas a 550 nm em um espectrofotômetro (do tipo leitor de ELISA). Os resultados foram expressos em nmols de $O_2^{\bullet -}$ por 10^6 neutrófilos gerados neste período de tempo, calculados como mostrado abaixo,^{31,32} obedecendo a estequiometria para a redução de um mol de citocromo *c* por um mol de $O_2^{\bullet -}$ e usando o coeficiente molar de extinção (ϵ) de 21.1 $mM^{-1} cm^{-1}$ (CHOVANIEC, 1978; DAHLGREN et al., 2007):

$$\Delta OD_{550} = OD_{550(\text{amostra})} - OD_{550(\text{referência [SOD]})}$$

$$\Delta OD_{550} \times 12,64 = \text{nmols } O_2^{\bullet -} / 10^6 \text{ neutrófilos} / 3 \text{ horas}$$

4.5. Teste de capacidade microbicida dos neutrófilos contra *M. tuberculosis*

Para avaliar a capacidade microbicida de neutrófilos sobre *M. tuberculosis*, foi realizado o ensaio de *killing*, de acordo com o protocolo sugerido por Green et al. (2007), com algumas modificações. Resumidamente, as suspensões padronizadas de *M. tuberculosis* (10^7 UFC/mL) não opsonizadas foram incubadas com neutrófilos humanos (10^6 /mL) a 37 °C, por 10, 30 e 90 minutos, acrescidos de glicose (10 mM), $CaCl_2$ (1 mM) e $MgCl_2$ (1,5 mM). Após cada um destes períodos de incubação, os grupos, incluindo os tratados ou não com Tempol (450 μM), foram tratados com PBS gelado (pH 7,4), para parar a atividade dos neutrófilos, e submetidos a uma centrifugação diferencial (100 x g durante 8 minutos) e, ambos, o *pellet* (que contém as micobacterias intracelular) e o sobrenadante (que contém as micobacterias extracelular) obtidos, foram diluídos em H_2O pH 11 (para lisar os neutrófilos) e, após sucessivas diluições em H_2O pH 11 (10^3 , 10^6 e 10^9), foram dispensados sobre o agar *Middlebrook 7H10*. Após isto, as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 . DPI (32 μM) foi utilizado para o controle de inibição do *burst* respiratório. Após o período de incubação (21 dias), o crescimento do *M. tuberculosis* foi mensurado pela contagem de colônias e os resultados expressos em UFC.

4.6. Determinação de viabilidade celular e ensaio de toxicidade do Tempol

Paralelamente, os neutrófilos tratados com Tempol nos mesmos períodos de tempo de incubação, para os experimentos supracitados, foram submetidos ao ensaio de redução do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium. Neste teste, 100 μL de neutrófilos ($10^6/\text{mL}$) foram adicionados aos poços e incubados ou não com Tempol (500 μM), após os períodos de incubação, equivalente aos tempos que são obedecidos para o *burst* respiratório, quantificação de NETs e ensaio de *Killing* (ou seja, até 4 horas de incubação), 10 μL de MTT foi adicionado e a placa novamente incubada por mais 4 horas, em seguida, as células foram tratadas com 10 μL de DMSO para solubilizar os cristais de Formazan. Por último, a leitura foi realizada (OD_{570}), e a possível redução na absorbância do grupo tratado com Tempol foi comparada ao controle contendo apenas neutrófilos. *Triton-X-100* foi utilizado como um controle positivo, sendo que a viabilidade dos neutrófilos tratados previamente com este composto foi considerada igual a 0 %.

4.7. Análises dos dados

Os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicatas independentes e as médias dos testes comparadas àquelas dos controles por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação múltipla de médias. Os níveis de significância (α) adotados foram de 5% (diferença entre as médias foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$). Para o cálculo das taxas de fagocitose (K_p) e *Killing* (K_k) foi utilizado a Planilha do Microsoft Office Excel 97-2003 (disponível em: <<http://www.otago.ac.nz>>), que executa os cálculos, partindo-se da entrada dos dados experimentais, neste trabalho, realizados em triplicata (GREEN et al., 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

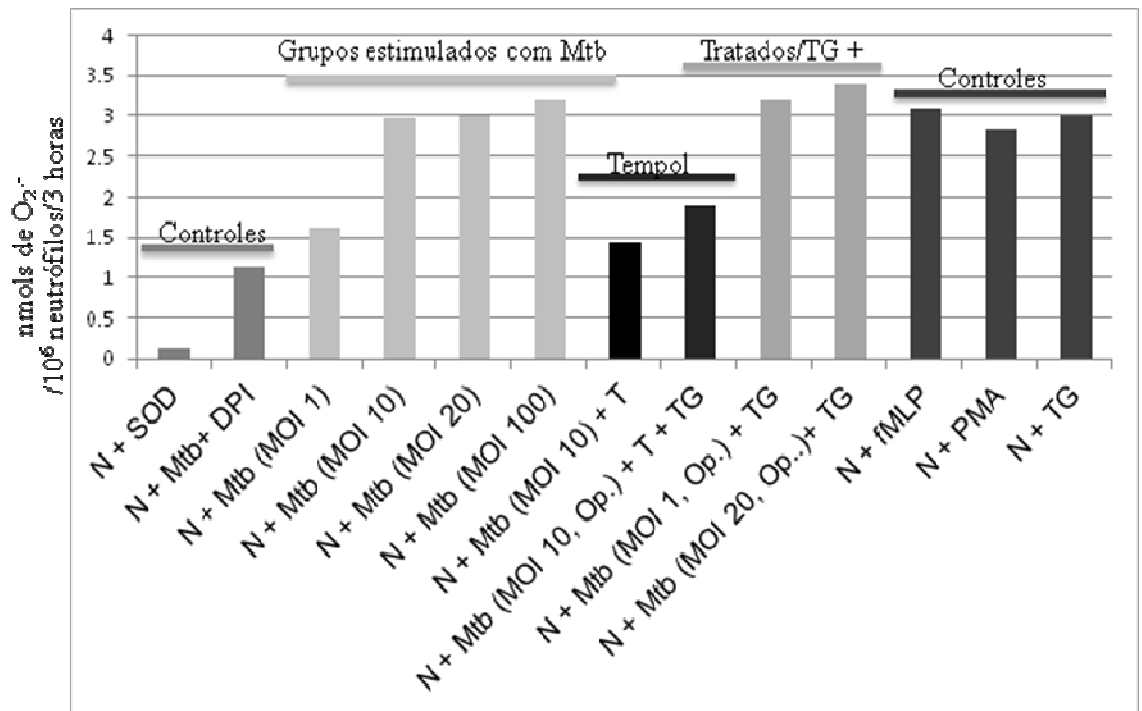
Burst oxidativo

Prévios trabalhos têm reportado a importância do *burst* oxidativo de células fagocíticas em resposta a infecções micobacterianas, principalmente contra *M. tuberculosis* na TB ativa (REDDY et al., 2004). Neste mesmo campo, estudos têm tentado estabelecer o verdadeiro *link* entre o *status* redox do hospedeiro nas infecções por *M. tuberculosis* e durante a TB ativa. Entretanto, a controvérsia dos resultados destes estudos aponta que, tanto os danos oriundos de um estresse oxidativo, quanto os provenientes de uma exacerbada resposta antioxidante, são de preocupante, portanto, o equilíbrio do *status* redox seria desejado, o que parece ser improvável de ser atingido, devido ser multifatorial.

Os resultados do *burst* respiratório conduzidos neste estudo, mostraram que o Tempol a 450 μM inibiu significativamente ($p < 0,05$) o *burst* respiratório nos grupos estimulados com *M. tuberculosis*, na concentração efetiva para reduzir 50 % do *burst* respiratório, previamente estabelecida ($\text{EC}_{50}=450 \mu\text{M}$). A quantidade em nmols de $\text{O}_2^{\cdot-}$ produzido pelos neutrófilos na presença ou ausência do Tempol, bem como os dados de unidade relativa de luz (URL) são apresentados abaixo (**Figs. 12. e 13.**).

Na clínica, a diminuição do *burst* oxidativo e da fagocitose tem sido descrita em variadas situações clínicas que predispoem pacientes infectados a TB, com ou sem comorbidades (SHALEKOFF et al., 1998). Cabe aqui ressaltar que, a cepa de *M. tuberculosis* aqui utilizada, a avirulenta (H37Ra), pode diferir na indução do *burst* oxidativo com relação a outras cepas, como a cepa virulenta (H37Rv) ou as cepas de diferentes isolados clínicos, pois como demonstrado em um recente estudo, estas cepas apresentam características distintas, como presença de diferentes PAMPs/antígenos, que levam a diferentes intensidades no *burst* oxidativo gerado por fagócitos em resposta a elas (STEENKEN & GARDNER, 1946; ZHENG et al., 2008; ROMERO et al., 2014).

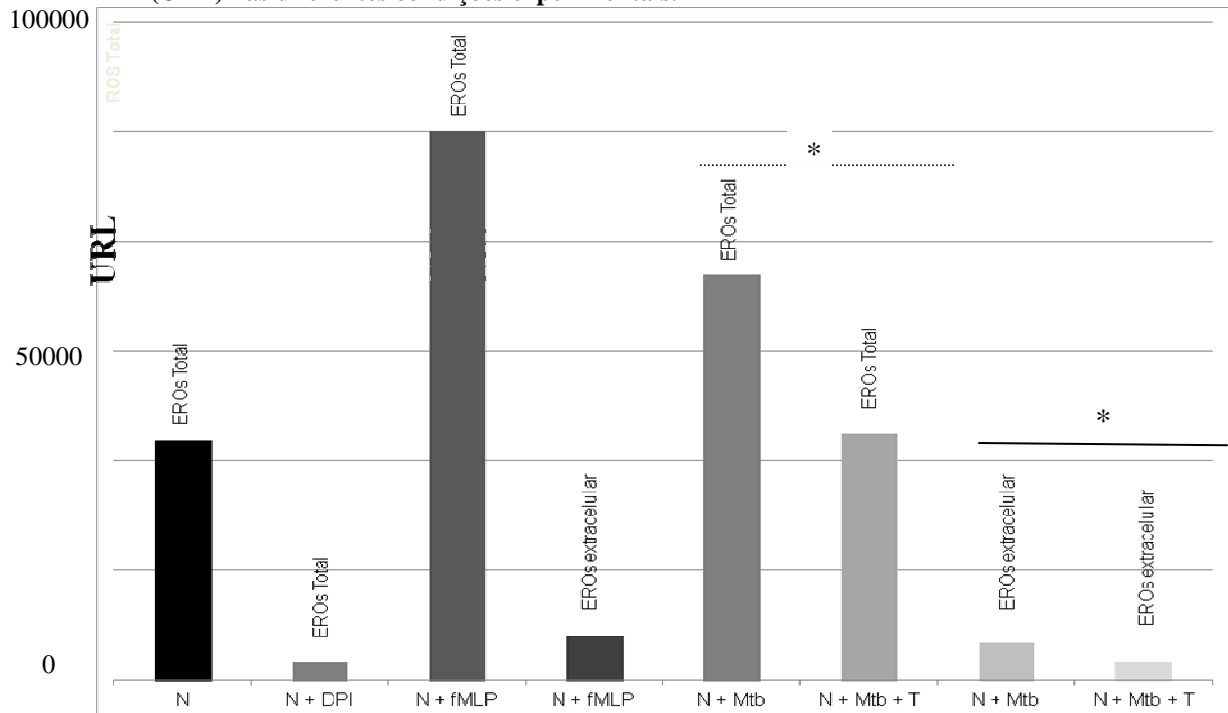
Figura 12. Valores de nmols de $O_2^{\cdot -}$ / 10^6 neutrófilos/3 horas produzidos por neutrófilos nas diferentes condições experimentais



Legenda: Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*; TG: Tapsigargina (4 μ M); N: Neutrófilos; fMLP : N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (40 μ M); T: Tempol (450 μ M); PMA: Ester phorbol 12-myristate 13-acetate (100 nM); Op: Mtb opsonizado; SOD: Superóxido dismutase (50 U/mL); DPI: Diphenyleneiodonium chloride (32 μ M), inibidor do *burst* oxidativo; Os valores de nmols $O_2^{\cdot -}$ / 10^6 neutrófilos/3 horas representam a média de uma triplicata de três experimentos independentes ($n = 3$), as quais foram consideradas significativamente diferentes (como comentados abaixo), quando $p < 0,05$, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Fonte: Autor

Figura 13. Avaliação do *burst* oxidativo dos neutrófilos, reportados em unidade relativa de luz (URL) nas diferentes condições experimentais.



Legenda: Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*; N: Neutrófilos; fMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (40 μM); T: Tempol (450 μM); DPI: Diphenyliodonium chloride (32 μM), inibidor do *burst* oxidativo. Os valores de URL, calculados durante o intervalo de 60 minutos, representam a média de três experimentos ($n = 3$), e foram consideradas significativamente diferentes (*), quando $p < 0,05$, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

Fonte: Autor

Na **Fig. 12.** pode ser observado que o Tempol inibiu significativamente ($p < 0,05$) o *burst* oxidativo dos neutrófilos humanos contra *M. tuberculosis* a uma concentração de 450 μM . *M. tuberculosis*, cepa H37Ra (“avirulenta”), a MOIs de 10, 20 e 100, apresentaram a mesma capacidade que PMA, fMLP e tapsigargina (TG) para elicitar o *burst* oxidativo dos neutrófilos (valores de $O_2^{\cdot -}$ induzido por estes estímulos são significativamente iguais, $p > 0,05$). A diferença entre a capacidade de indução do *burst* respiratório variando-se MOI, avaliados por este método, mostrou que um incremento na MOI de 10 para 20, promoveu um pequeno incremento no estímulo, e pouca foi esta diferença quando ocorreu uma brusca variação da MOI de 10 para 100. Isto pode ser explicado, ao menos em parte, por uma possível saturação do sistema de geração de oxidantes, ou por uma indução de apoptose, uma vez que MOIs muito altas já foram reportadas como sendo um comum desencadeador deste desfecho bioquímico (MATSUDA et al., 1999). Mais recentemente, a indução de NETose quando utilizadas altas MOI também foram relatadas (PALMER et al., 2012). Segundo os autores Jackson et al., (2004); Hosseinzadeh et al. (2012), na inibição do *burst* oxidativo, a EC_{50} para o Tempol pode variar de 54 a 2000 μM . Corroborando com tal intervalo, neste

estudo foi previamente estabelecida uma EC_{50} de 450 μM para o Tempol (dados não mostrados) contra *M. tuberculosis*, pelo teste com o citocromo *c*, e os dados aqui apresentados (**Fig. 12.**) evidenciaram que tal concentração foi ideal para reduzir especificamente o $O_2^{\bullet-}$ extracelular em quase 50 %, e ela foi próxima de 50 % para a redução de EROs extracelular, avaliados pelo teste com o Isoluminol (**Fig. 13.**), mas de qualquer forma, significativa ($p < 0,05$) comparada ao grupo não tratado. Com uma concentração de 450 μM , Tempol não reduziu 50 % de EROs total (intracelular e extracelular, incluindo H_2O_2 , HO^{\bullet} , entre outros oxidantes), avaliados com o Luminol, mas a redução foi significativa comparada ao grupo apenas estimulado com *M. tuberculosis* ($p < 0,05$), e próxima ao valor de 50 % (**Fig. 13.**).

Os anions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) formados através do sistema NOX2 fagocítico apresentam decomposição enzimática (por SOD) na velocidade de aproximadamente $5 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ em pH 7. Se por um lado à formação deste oxidante é fundamental durante a resposta imune contra patógenos, atualmente, é bem conhecido o papel do $O_2^{\bullet-}$ no câncer, na gênese de doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas, apesar do $O_2^{\bullet-}$ apenas não ser capaz de danificar o DNA de forma direta (BATTIN et al., 2009).

O N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), um fator quimiotático presente em certos microrganismos, elícita EROs não apenas por acionar a proteína quinase C (PKC), que é uma molécula *upstream* a NADPH oxidase, mas também por alternativamente acionar *mTOR*, que é um *upstream* a maquinaria de autofagia, a qual também tem sido demonstrada promover a citrulinização de histonas, portanto sendo esta uma rota alternativa para a indução de NETs em neutrófilos (ITAKURA & McCARTY, 2013). Neste estudo, o fMLP foi considerado um potente indutor do *burst* oxidativo de neutrófilos (**Figs. 12. e 13.**), por ambos os métodos avaliados. Tapsigargina (TG) é uma substância conhecida por causar um estresse do retículo endoplasmático rugoso e induzir uma maior montagem do sistema NOX2. Isto ocorre através de um desequilíbrio nas concentrações de Ca^{2+} intraluminal após prévio contato com TG, conduzindo a um acúmulo de proteínas desdobradas, induzindo maior disponibilidade de componentes do complexo NOX2 (GUPTA et al., 2010). Interessantemente, pode ser observado neste estudo que além de uma considerável indução do *burst* oxidativo em neutrófilos (**Fig. 12.**), esta substância também foi capaz de restaurar os níveis de EROs em neutrófilos inibidos pelo Tempol. Levando-se em conta as concentrações utilizadas de TG e Tempol e o efeito de TG em induzir *burst* respiratório, muito provavelmente, isto indica que se faz necessário maiores concentrações de Tempol para reduzir EROs quando em associação com TG, comparados aos grupos não tratados com TG.

Além disso, TG aumentou o *burst* oxidativo dos neutrófilos contra *M. tuberculosis* em duas diferentes MOIs avaliadas.

A inativação de *M. tuberculosis*, realizada neste estudo, para a indução do *burst* oxidativo, sinaliza para um já conhecido mecanismo que envolve o reconhecimento das micobacterias por fagócitos profissionais, incluindo neutrófilos, através de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Tal reconhecimento se deve em parte pela expressão de receptores pelos neutrófilos, conhecidos como receptores de reconhecimento dos padrões (PRRs) (ERNST, 1998). A diferença encontrada para o *burst* oxidativo avaliados por diferentes metodologias, na resposta de neutrófilos ao *M. tuberculosis* viável e contra o *M. tuberculosis* inativado pelo calor, embora mínimas, pode ocorrer, e mesmo que exista uma controvérsia a respeito da possibilidade de sub/superestimar os reais valores do *burst* respiratório em tais medidas, ao menos em parte, isto pode ser explicado pela produção de grandes quantidades de enzimas com atividade antioxidante pelo *M. tuberculosis* vivo, isto é corroborado por prévios estudos que mostram que, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o aumento na expressão de genes para AhpC, KatG e SOD em *M. tuberculosis* são fatores relacionados à sobrevivência da micobactéria dentro dos fagócitos (COLE et al., 1998). Além disso, a resposta pode ser também mais exacerbada, devido à viabilidade micobacteriana. Neste contexto, tais células fagocíticas, além de lançar mão de outros mecanismos de defesa, tenta explorar o *burst oxidative* para a eliminação do *M. tuberculosis* via produção de EROs/ERNS (DENIS, 1991), embora em infecções persistentes tenha sido observadas as expressões aumentadas de tais sistemas de detoxificação do *burst* oxidativo e, em modelos de estresse nitrosativo e oxidativo contra *M. tuberculosis* (HU & COATES, 2009). Adicionalmente, KatG e AhpC também medeiam a resistência de *M. tuberculosis* a isoniazida, sendo assim um mecanismo *pleiotrópico* da defesa micobacteriana (DHANDAYUTHAPANI et al., 1996).

Com relação ao complexo contexto no *status* redox do hospedeiro durante a infecção por *M. tuberculosis* ou a TB ativa, existem diferentes fatores a se considerar para o equilíbrio de tal *status*, tais como as características de virulência do *M. tuberculosis* (Ex. produção exagerada de SOD e Kat-G), fatores relacionados ao hospedeiro, diferentes fatores ambientais (Ex. nutrição, isto pode incluir uso ou não de suplementação antioxidante), fatores genéticos (ex. competência da resposta imune) e, em casos da TB ativa, regime terapêutico com o uso de medicamentos altamente complexos quanto à promoção de um desequilíbrio no *status* redox do hospedeiro, não apenas a nível local da infecção pulmonar, mas também generalizado, pelo metabolismo dos fármacos depletarem os níveis de glutathiona (GSH), em

que uma marcante redução nos níveis de GSH é observada (DALCOLMO et al., 2007; BUTOV et al., 2013). De acordo com Wiid et al. (2005), durante a TB ativa, os níveis de antioxidantes no paciente são baixos (avaliado segundo o *status* total antioxidante, do inglês *total antioxidant status* [TAS]), isto se deve ao regime terapêutico para tratar a TB, em que, o metabolismo dos fármacos induzem um estresse oxidativo. Por outro lado, segundo Cole et al. (1998), as altas concentrações de KatG e SOD produzidas localmente pelo *M. tuberculosis* agravam ainda mais este desbalanço.

Contudo, Morris et al. (2013) observaram que uma formulação lipossomal contendo GSH (L-GSH), direcionada a neutrófilos, pode incrementar os níveis intracelulares de GSH e, dessa forma, resultando na redução intracelular de EROs conduzindo a um aumento da acidificação dos fagossomos contendo o *M. tuberculosis* e inibição do crescimento das micobactérias. Assim, um novo mecanismo adotado por neutrófilos para controlar a infecção por *M. tuberculosis* tem sido descrito.

Segundo a American Thoracic Society (ATS), o tratamento de escolha para tuberculose (TB) na atualidade consiste em antimicrobianos de primeira linha, a isoniazida (INH), rifampicina (RMP) pirazinamida (PZA) e etambutol (BEM), sendo que esta associação de fármacos combina as ações bactericidas, de prevenção de resistências e de esterilização, por um período de tempo suficientemente longo, de forma a evitar falências de tratamento e recaídas. A escolha do esquema terapêutico baseia-se na compreensão da biologia do *Mycobacterium tuberculosis*, no hospedeiro e nas atividades específicas dos fármacos, considerando-se a prevalência e o padrão de susceptibilidade da tuberculose na comunidade em questão. A segunda linha é utilizada na falência da primeira opção, sendo constituída por fármacos como as fluorquinolonas e estreptomicina (CDC, 2003).

Os fármacos constantes do regime terapêutico de primeira linha contra a TB, isoniazida, rifampicina e etambutol, são classicamente conhecidos por produzir um estresse oxidativo em pacientes sob o regime terapêutico, além de reduzir o Zn^{2+} (antioxidante) plasmático. Butov et al. (2013) conduziram um estudo com 74 pacientes com MDR-TB, 66 pacientes com TB não MDR e 30 voluntários sem TB (controle), afim de se avaliar a influência dos dois tipos de TB sobre o *status* redox dos voluntários. Segundo estes autores, o uso de suplementação antioxidante durante o regime terapêutico da TB é aconselhável. Além disso, o tempo de tratamento da TB, que é longo, a associação com outros agentes terapêuticos, principalmente, frutos do surgimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes, agravam ainda mais as mudanças no *status* redox, por aumentar a quantidade de

fármacos que promovem os danos oxidativos (BUTOV et al., 2013). Os novos fármacos para tratar TB multi-resistente que estão sendo aprovados (ex. Sirturo [bedaquiline]), também proporcionam sérios efeitos tóxicos, incluindo sérios danos oxidativos.

A importância do equilíbrio redox nas infecções por *M. tuberculosis* ou na TB ativa tem sido reportada (YUNIASTUTI, 2012). Efeitos deletérios sobre biomoléculas, como a peroxidação lipídica e oxidação proteica são eventos que podem ocorrer quando ocorre um “estresse oxidativo”, comum em pacientes com TB (REDDY et al., 2004). Neste estudo, Tempol foi capaz de reduzir o *burst* respiratório de neutrófilos humanos em um modelo experimental *ex vivo*, contra *M. tuberculosis*. Este fato pode ser considerado uma característica desejável em alguns casos, como aqueles em que a resposta exacerbada ao *M. tuberculosis* é deletéria ao hospedeiro humano. Por outro lado, Tempol, um potente antioxidante, também poderia comprometer a resposta imune ao *M. tuberculosis*, predispondo infectados a TB, ou agravando um estado de TB ativa.

A despeito da opsonização das micobactérias e as diferentes formas de opsonização, isto pode modular a intensidade do *burst*, conseqüentemente, na avaliação de NETs, a quantidade destas estruturas formadas podem ser alteradas, pois, estudos têm mostrado que opsonização prévia aumenta a exposição de receptores (CR3, Fc γ), assim, à formação de NETs pode sofrer uma *up-regulation* de forma direta por permitir maior ligação de micobactérias ou por modular de forma indireta ativando vias alternativas para a sua formação. Por outro lado, microrganismos não opsonizados também induzem o *burst* oxidativo efetivamente, entretanto, por outras vias de sinalização, como as relacionadas aos PRRs dos fagócitos, tais como os *Toll-like receptors* (TLRs), que reconhecem “diretamente” os PAMPs (PALMER et al., 2012).

Com relação às espécies altamente reativas do oxigênio, devido à meia vida associada e a capacidade de atravessar ou não membranas biológicas, algumas destas espécies oxidantes são de difícil detecção, de modo que os usos de específicas sondas fazem-se necessárias (HAMPTON et al., 1996). Até o momento, nenhuma técnica/método tem se mostrado capaz de avaliar o *burst* oxidativo e estabelecer um satisfatório e coesa ligação entre este evento e a paralela atividade antimicrobiana ou evento inflamatório associado, bem como já era conhecida à independência entre o evento inflamatório e a atividade microbicida (*Killing* de microrganismos) (DAHLGREN et al., 2007; AMORIM et al., 2014). Assim, embora neste trabalho EROs/ERNs total bem como O₂^{•-} tenham sido aqui avaliados, é aqui reconhecido o complexo processo que governa a ação microbicida, sendo que EROs/ERNs são coadjuvantes num contexto em que outros potentes agentes microbicidas, tais como as enzimas com ação

antimicrobiana, DNA, histonas e ETs são cruciais para a efetiva atividade antimicrobiana (HALVERSON et al., 2015).

No contexto de um papel de dualidade desempenhada pelos oxidantes (PAIVA & BOZZA, 2014), formado posteriormente a geração de $O_2^{\cdot-}$ pelo sistema NOX-2, o radical hidroxila (HO^{\cdot}), uma espécie altamente reativa do oxigênio gerado através da ação da MPO, ou pela reação de Fenton (**Fig. 2.**), apresenta decomposição espontânea, em torno de 10^{-9} segundos, restringindo sua localização as proximidades onde são formados os anions superóxidos/ H_2O_2 . O radical HO^{\cdot} é altamente reativo e pode causar intenso dano intracelular, tendo grande potencial para oxidar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (HALLIWELL, 1999; BENZIE, 2000; BATTIN et al., 2009).

A diminuição de espécies altamente reativas do oxigênio *in vivo* pode representar um evento marcante no curso da infecção pelo *M. tuberculosis* ou durante a TB. De acordo com Catherine et al. (2013), é conhecido o papel de fármacos que matam efetivamente microrganismos através da geração de espécies altamente reativas do oxigênio, como os radicais HO^{\cdot} gerados pela via de Fenton (**Fig. 2.**), assim os autores demonstraram que, a vitamina C, uma substância conhecida por induzir e amplificar a reação de Fenton, pode efetivamente guiar um efetivo *Killing* de cepas sensíveis e resistentes do *M. tuberculosis in vivo*. Como já reconhecido pelos autores, o pleiotropismo deste evento é marcante, uma vez que como também aqui observado, a vitamina C, em concentrações ideais pode ser um aliado na diminuição do estresse oxidativo imposto pela terapia anti-TB, ao mesmo passo que ela também pode diminuir a formação de armadilhas extracelulares e, aumentando ainda mais este complexo contexto, paradoxalmente, em grandes concentrações, apresentar um efeito pró-oxidante a nível sistêmico (PODMORE et al., 1998; BREWER et al., 2013; MOHAMMED et al., 2013). Além disso, desde que o *M. tuberculosis* dispõem de diferentes mecanismos para colonizar fagócitos e sobreviver dentro deles sobre as mais variadas condições de estresse, incluindo o estresse oxidativo (EHRT & SCHNAPPINGER, 2009), torna-se difícil mensurar a efetiva participação de EROs/ERNs na resposta imune contra o patógeno e, portanto, a possível influência do Tempol. Como exemplos a proteína KefB, presente na parede celular de *M. tuberculosis*, moléculas com a propriedade de chaperonas (Alpha-crystallin [Acr]), algumas isoformas de SOD e de KatG, tióis peroxidases, além de, todos conhecidos fatores de virulência de *M. tuberculosis*, afetam a produção de EROs/ERNs *in vivo*, levando a uma diminuída produção de oxidantes por fagócitos e conseqüente menor taxa de *Killing* das micobactérias (FORRELLAD et al., 2013).

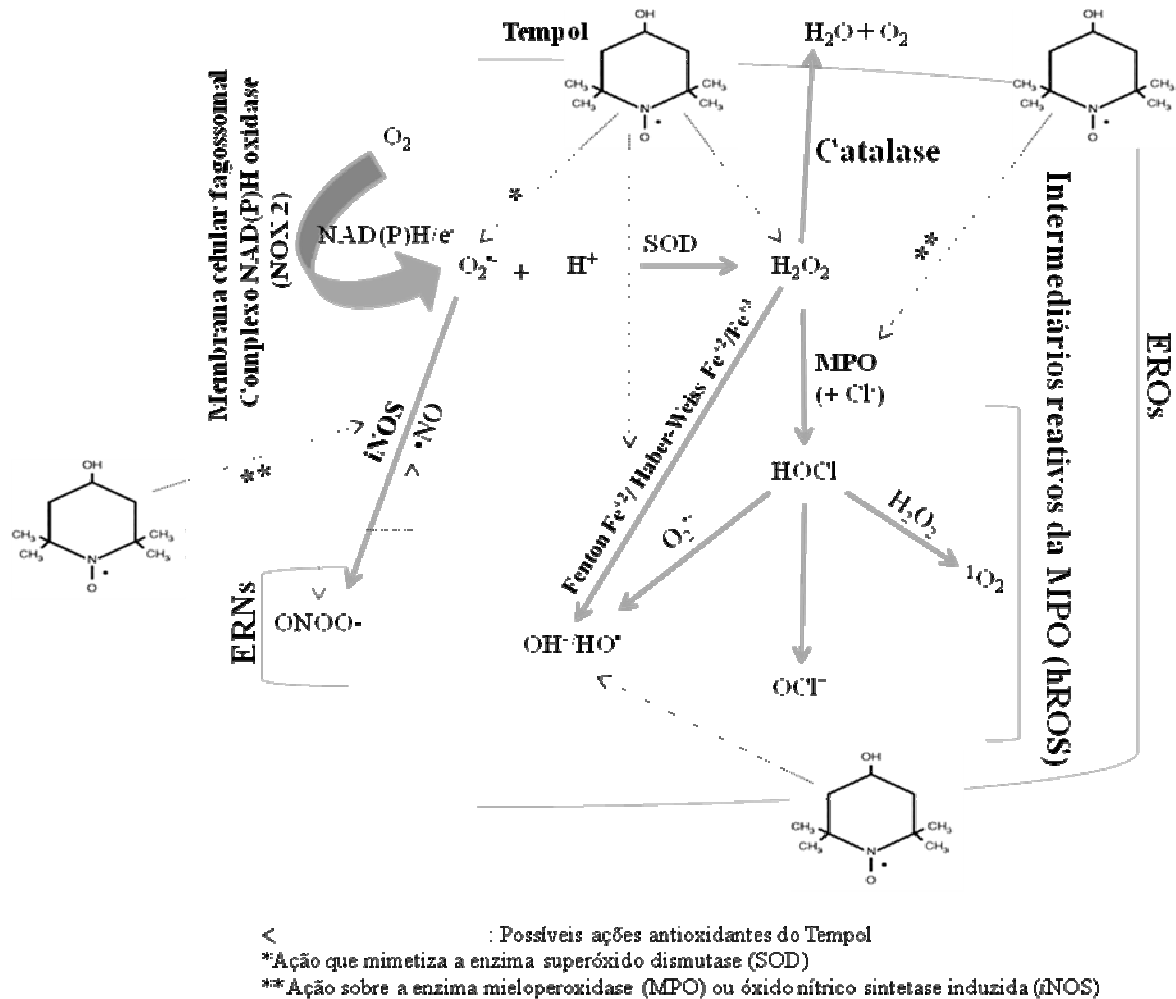
Tempol é um potente antioxidante capaz de proteger lipídios de lipossomos do ataque

oxidante da radiação γ (SAMUNI & BARENHOLZ, 2003). Este antioxidante tem ampla capacidade de permear membranas celulares, portanto atuando sobre os oxidantes intracelulares e extracelulares, interagindo principalmente com $\cdot\text{OH}$, ONOO^- , $\text{NO}\cdot$, $\text{O}^{\cdot-}$, H_2O_2 e também apresentando atividade sobre algumas enzimas fagocíticas. Assim, o Tempol tem sido descrito na literatura como um antioxidante multifuncional (**Fig. 14.**), atuando inclusive sobre as espécies altamente reativas do oxigênio, dessa forma, afetando o *status* intra e extracelulares de diferentes oxidantes, não apenas por atuar como um “*scavenger*” de EROs/ERNs, mas também pela atuação sobre enzimas e intermediários na geração destes oxidantes (**Fig. 15.**). A maior atividade do tempol nas concentrações utilizadas neste estudo é como um mimético da enzima SOD, isto explica os resultados aqui demonstrado, em que houve uma marcante diminuição na formação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo Tempol a $450\ \mu\text{M}$. Tempol também é efetivo como um mimético da catalase previne a geração de $\text{HO}^-/\text{HO}\cdot$ proveniente do H_2O_2 na presença de metais de transição na reação de Fenton (**Fig. 14.**) (WILCOX, 2010). Tempol também atua sobre o HO^- , contudo, dado o pH do ambiente celular, esta interação conta por apenas 10 % de redução deste oxidante pelo Tempol (SUY et al., 1998; WILCOX, 2010).

Embora as espécies reativas do nitrogênio (ERNs), historicamente, tenham sido descritas como os principais oxidantes responsáveis pela atividade microbicida (*Killing*) do *M. tuberculosis*, recentemente, tem sido reconhecido com um notório destaque a participação e importância das espécies reativas do oxigênio (EROs) na ação antimicrobiana (Hawn et al., 2013), principalmente dos radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) (CATHERINE et al., 2013).

Neste estudo, o intervalo de avaliação do *burst* oxidativo, através do ensaio de quimioluminescência amplificada, com o uso do Luminol para avaliar EROs/ERNs totais, intra e extracelulares, foi de 60 min. É aqui reconhecido que, a ação conjunta entre a ativação do sistema NADPH oxidase para gerar $\text{O}_2^{\cdot-}$ e, a expressão/ativação de *i*NOS, que gera $\cdot\text{NO}$, que posteriormente interage com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar ONOO^- (uma ERN com potente ação antimicrobiana), requer um considerável tempo e, portanto, talvez uma quantidade satisfatória/efetiva de ERNs não seja produzida no intervalo de 60 min por neutrófilos estimulados com *M. tuberculosis*.

Figura 14. Possíveis ações do Tempol sobre as espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) geradas por fagócitos.



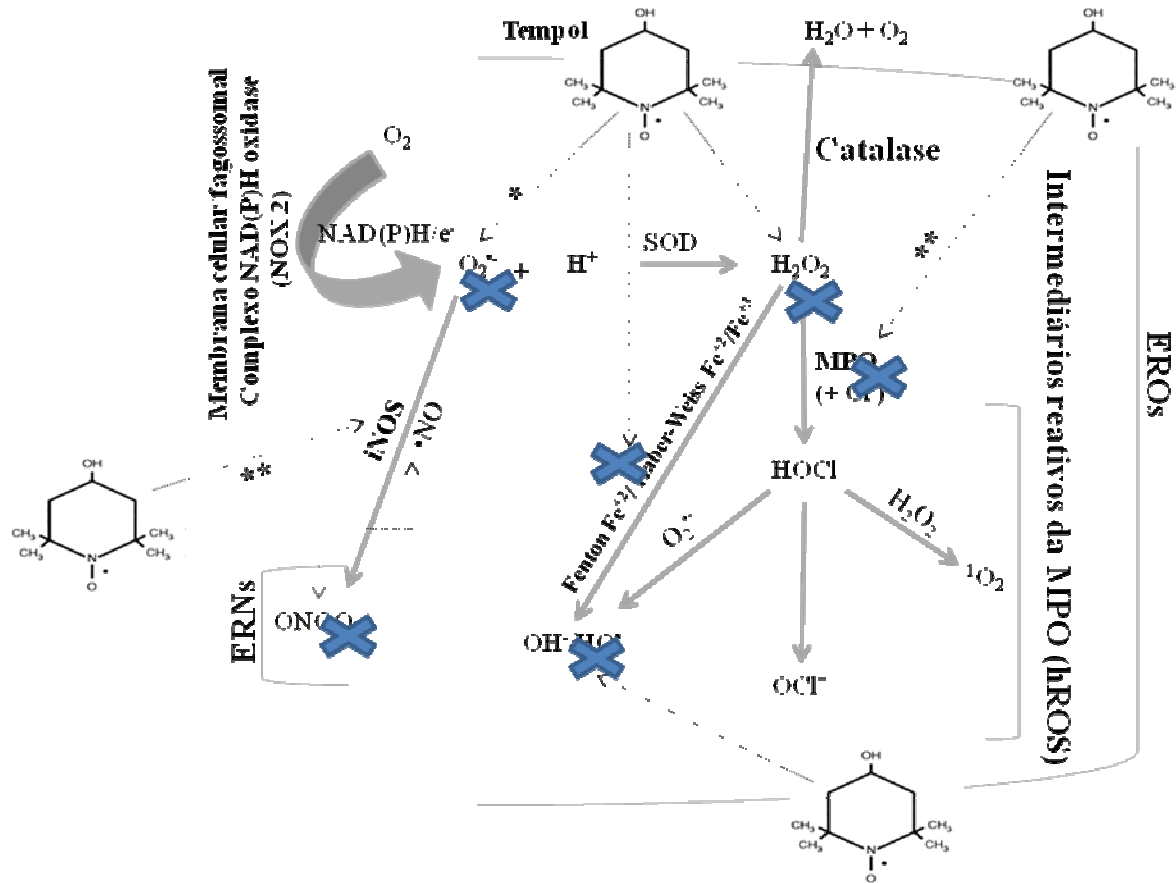
Legenda: NAD(P)H nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; EROs/ERNs: espécies reativas do oxigênio/nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; MPO: mieloperoxidase; SOD: superóxido dismutase; hROS: espécies altamente reativas do oxigênio (*highly reactive oxygen species*); $O_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; HOCl: ácido hipocloroso; OCl⁻: ânion hipoclorito; 1O_2 : oxigênio singlete; •NO: óxido nítrico; HO•: radical hidroxila; H₂O₂: peróxido de hidrogênio. Pela ação da MPO fagocítica, são formadas as hROS.

Como mostrado na figura, Tempol pode apresentar uma vasta gama de atividade (multifuncional), atuando sobre os oxidantes: •OH, ONOO⁻, NO•, $O_2^{\cdot-}$, H₂O₂, bem como sobre as enzimas iNOS e MPO, responsáveis pela formação de potentes oxidantes. Além disso, este nitróxido pode aceitar o e⁻ proveniente do metal reduzido (Fe⁺²) na reação de Fenton, portanto, evitando a formação de HO•/ HO• por inibir esta rota. (SOULE et al., 2007).

Observação: Neste esquema de representação esquemática, é apresentado uma extremamente simplificada visão geral, portanto, as reações químicas/interações não estão balanceadas.

Fonte: Autor

Figura 15. Representação esquemática dos possíveis oxidantes afetados pela ação do Tempol.



Legenda: NAD(P)H nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; EROs/ERNs: espécies reativas do oxigênio/nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; MPO: mieloperoxidase; SOD: superóxido dismutase; hROS: espécies altamente reativas do oxigênio (*highly reactive oxygen species*); $O_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; ONOO $^-$: peroxinitrito; HOCl: ácido hipocloroso; OCl^- : anion hipoclorito; 1O_2 : oxigênio singlete; $\cdot NO$: óxido nítrico; $HO\cdot$: radical hidroxila; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. Pela ação da MPO fagocítica, são formadas as hROS. X: representa inibição e/ou diminuição;

Como mostrado na figura, Tempol pode apresentar uma vasta gama de atividade (multifuncional), atuando sobre os oxidantes: $\cdot OH$, ONOO $^-$, $\cdot NO$, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , bem como sobre as enzimas iNOS e MPO, responsáveis pela formação de potentes oxidantes. Além disso, este nitróxido pode aceitar o e^- proveniente do metal reduzido (Fe^{+2}) na reação de Fenton, portanto, evitando a formação de $HO\cdot$ / HO^- por inibir esta rota. (SOULE et al., 2007).

Assim, a quantidade intra e extracelulares de diferentes oxidantes são afetadas pelo Tempol, principalmente devido ao fato de que às reações sequenciais que ocorrem a partir de um dado oxidante são afetadas.

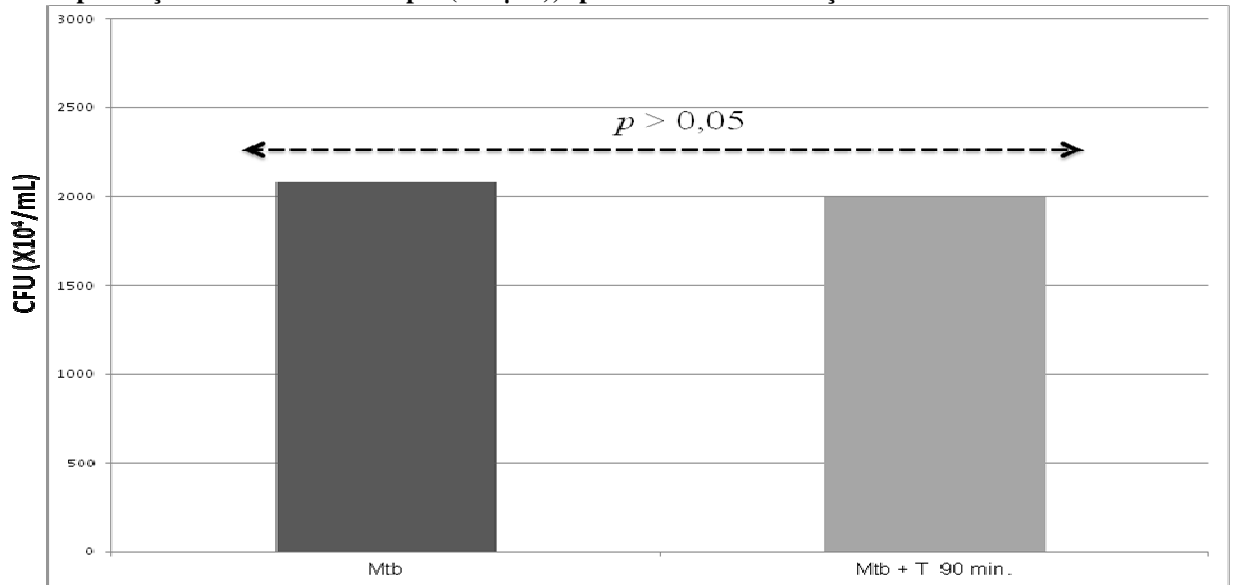
Observação: Neste esquema de representação esquemática, é apresentado uma extremamente simplificada visão geral, portanto, as reações químicas/interações não estão balanceadas.

Fonte: Autor

Ensaio de *Killing*

Os resultados dos ensaios de *Killing* são mostrados na íntegra nas **Figs. 16.** e **17.** Na **Fig. 16.**, é demonstrado que *M. tuberculosis* não sofreu interferência do Tempol (também observado em detalhes na **Fig. 18., A.**), com relação ao seu crescimento quando cultivado com este composto. O número de unidade formadora de colônias, UFC, demonstrados na **Fig. 16.**, para o crescimento de apenas *M. tuberculosis*, foi considerado o controle para a comparação da avaliação da ação microbicida dos neutrófilos contra *M. tuberculosis* e, nas mesmas condições, mas tratados com Tempol. Os resultados da **Fig. 17** mostram que em 5 minutos, os neutrófilos significativamente reduziram a carga bacilar ($p < 0,05$), comparadas a UFC evidenciada na **Fig. 16.** Segundo Green et al. (2007), a centrifugação diferencial realizada neste ensaio, permite acompanhar ao longo do tempo a variação nas cargas bacilar extracelular (sobrenadante) e intracelular (*pellet*). Após 30 minutos de incubação, a carga bacilar do *pellet*, que representa às micobactérias intracelular, ligeiramente aumenta, contrariando o preceito da redução, que normalmente acontece com as micobactérias encontradas no sobrenadante (referente às micobactérias extracelular, que estão sendo fagocitadas). Isto se deve ao fato de que neste intervalo de tempo, muitas micobactérias foram fagocitadas (ou seja, adentraram ao espaço intracelular), mas ainda não mortas. Por outro lado, no intervalo de transição entre 30 e 90 minutos, uma marcante redução bacilar é observada no *pellet* (**Fig. 17** e **Fig. 18., B.**), ou seja, dos *M. tuberculosis* localizados intracelular.

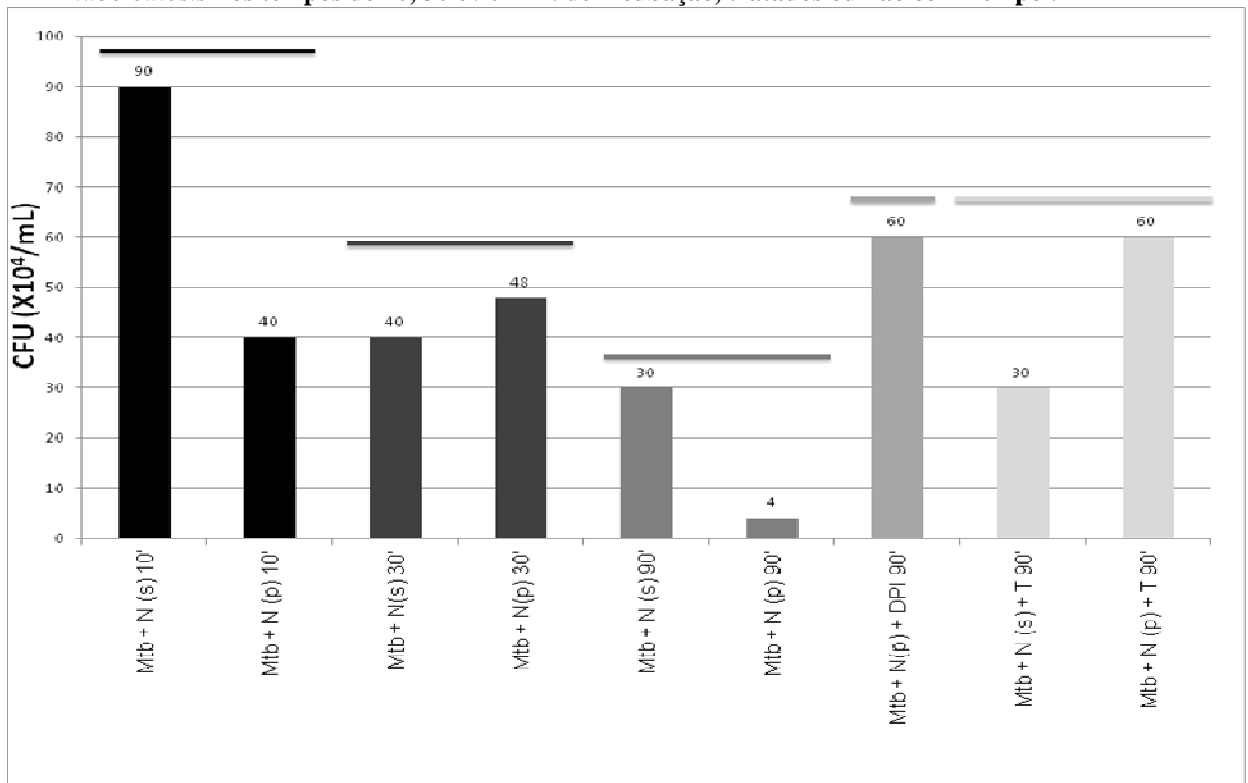
Figura 16. Número de unidade formadora de colônias (UFC) de *Mycobacterium tuberculosis*, na presença ou ausência do Tempol (450 μM), após 90 min. de incubação.



Legenda: CFU: colony-forming unit; Os valores de CFU ($\times 10^4/\text{mL}$) representam a média de três experimentos ($n = 3$), as quais foram consideradas significativamente iguais, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Fonte: Autor

Figura 17. Avaliação da capacidade microbicida dos neutrófilos contra *Mycobacterium tuberculosis* nos tempos de 10, 30 e 90 min. de incubação, tratados ou não com Tempol.



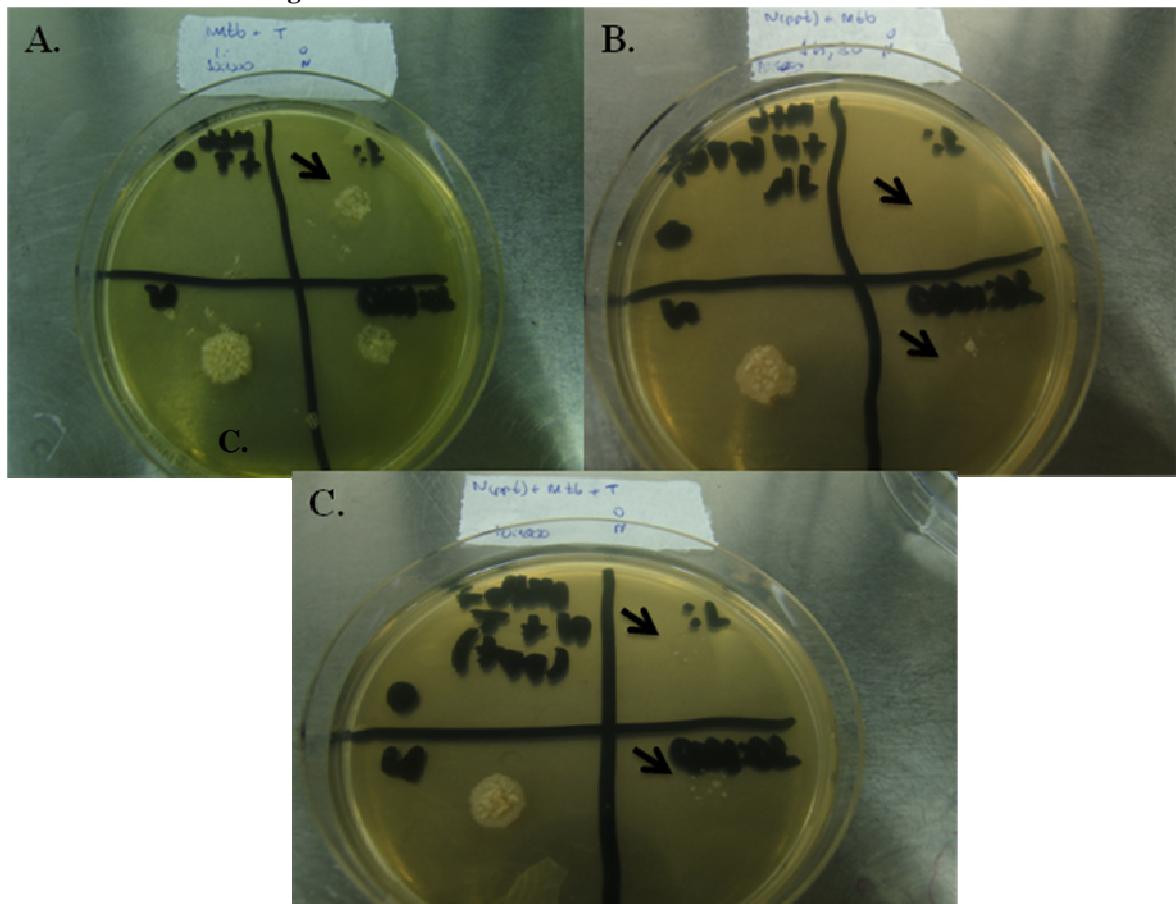
Legenda: Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*; N: Neutrófilos; T: Tempol (450 μM); DPI: Diphenyleneiodonium chloride (32 μM); s: sobrenadante, equivalente as micobactérias extracelular; p: pellet, equivalente as micobactérias intracelular.

Fonte: Autor

Fagocitose, taxa de *Killing*, intensidade de estímulo do *burst* oxidativo e quantidade de NETs lançadas para o espaço extracelular, estes são mecanismos que têm sido propostos como dependentes da MOI (LEIJH et al., 1970; HAMMER et al., 1981; MATSUDA et al., 1999; YOUNG et al., 2011). Entretanto, segundo Li et al. (2002), em ensaios de *Killing*, para a razão de bactérias efetivamente mortas por neutrófilos ou monócitos, o que é considerado “crítico” é a quantidade de células inicialmente incluídas no sistema, que deve ser superior a $3-4 \times 10^5$ células/mL, sendo tal atividade pouco influenciada pela razão de microrganismos por célula estudada, ou seja, independe da MOI. Neste estudo, a MOI utilizada foi de 10, como sendo a quantidade idealmente reportada por Green et al. (2007), mas o número de neutrófilos iniciais foram de 10^6 /mL. Interessantemente, o número mínimo de células exigidas neste ensaio ($3-4 \times 10^5$ células/mL), é próxima ao número mínimo ($\leq 5 \times 10^5$ /mL) necessário para predispor humanos as doenças infecciosas bacterianas e fúngicas (LI et al., 2002).

Os autores Schlesinger, (1993); Cywes et al. (1999); Velasco-Velázquez et al. (2003) relataram que *M. tuberculosis* não opsonizados com C3b_i tem a mesma capacidade de ligação ao receptor CR3. Neste caso, CR3 também serve como um PRP de fagócitos, desta forma ele reconhece uma específica cápsula polissacarídica presente em *M. tuberculosis*, que é um PAMP, e permite à ligação desta em outro sitio, que não aquele da ligação com C3b_i, tendo o *M. tuberculosis*, portanto, o mesmo grau de fagocitose que as micobactérias opsonizadas. Tal suposição de que *M. tuberculosis* não opsonizados poderia ligar-se com eficácia aos receptores dos fagócitos, surgiu do fato de que componentes do complemento poderiam ser limitados no espaço alveolar dos pulmões nos estágios iniciais da infecção, devido à formação e o tempo requerido para sair do plasma e alcançar tais órgãos, mas mesmo assim em infecções por *M. tuberculosis*, nos estágios iniciais, observava-se uma efetiva resposta de fagócitos, independente da ativação do complemento ou da resposta imune humoral (por exemplo, com a formação de IgG) (STOKES et al., 1993; VELASCO-VELÁZQUEZ et al., 2003). No ensaio de *Killing* avaliado em nosso estudo, as micobactérias não foram opsonizadas, e os tempos de leitura foram adaptados para 10, 30 e 90 minutos, tendo sido observados relevantes resultados corroborando a premissa de que não há necessidade de prévia opsonização para uma eficiente fagocitose de *M. tuberculosis*.

Figura 18. Avaliação da capacidade microbicida dos neutrófilos contra *Mycobacterium tuberculosis* em agar Middlebrook 7H10.



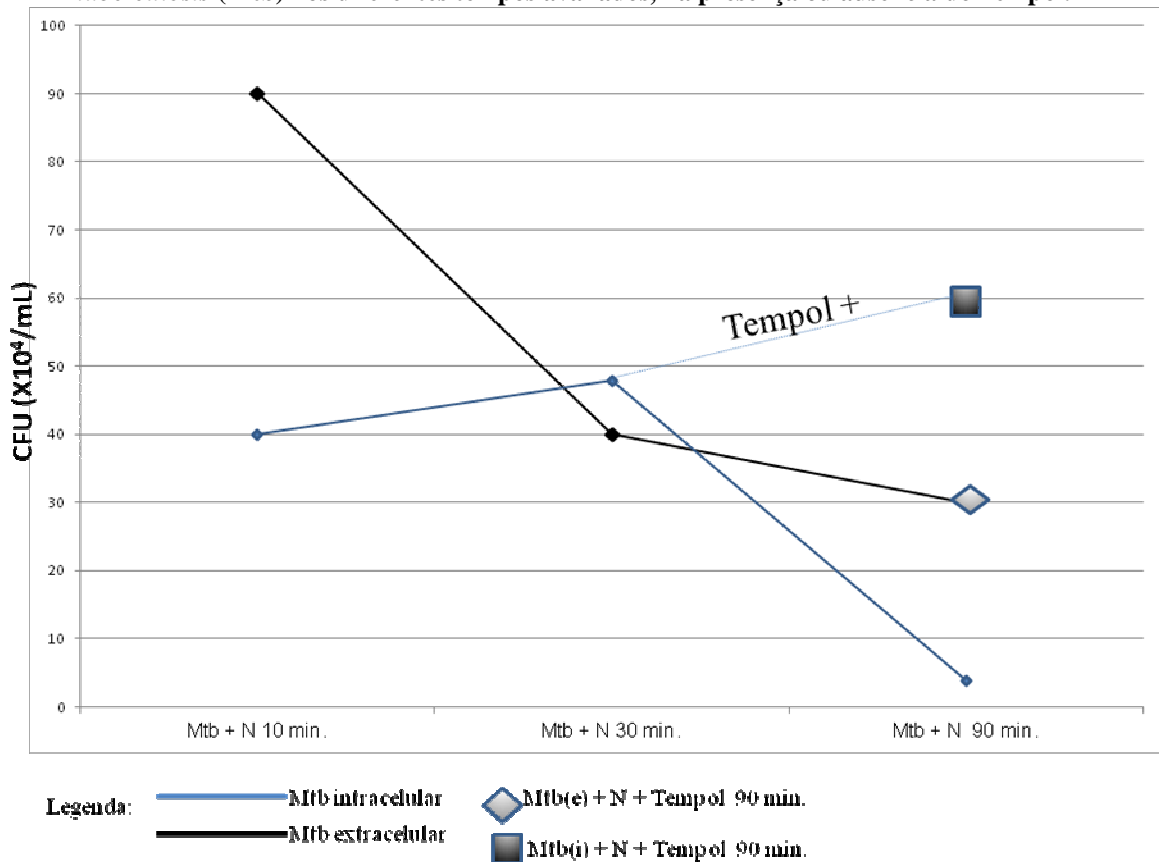
Legenda: **A.** A figura A. mostra que na incubação de apenas *Mycobacterium tuberculosis* e Tempol, não houve interferência significativa ($p > 0,05$) do Tempol ($450 \mu M$) sobre o crescimento das micobactérias (vide seta, em que no quadrante referente à máxima diluição, tratado com Tempol, não houve interferência no crescimento micobacteriano); **B.** Neutrófilos não tratados com Tempol ($450 \mu M$) foram eficientes em matar *M. tuberculosis* no meio intracelular (análise do *pellet*), como indicado pela seta, que mostra que, na máxima diluição realizada, não houve crescimento micobacteriano e, na diluição anterior, poucas UFC foram observadas; **C.** O tratamento com Tempol ($450 \mu M$) inibiu a atividade microbicida dos neutrófilos contra os *M. tuberculosis* intracelular (vide seta), tendo sido observado um grande número de UFC no quadrante da máxima diluição realizada.

Fonte: Autor

Como observado nas **Figs. 17. e 18., C.**, Tempol inibiu significativamente ($p < 0,05$) a ação microbicida dos neutrófilos frente *M. tuberculosis* intracelular (*pellet*), evidenciados pelo aumento no número de UFC. Com relação a uma possível ação microbicida do Tempol no espaço extracelular sobre as micobactérias, não houve significativa interferência deste composto sobre tal ação.

A **Fig. 19.** resume o que aconteceu com as micobactérias intracelular e extracelular ao longo dos períodos de tempo avaliados para a ação microbicida dos neutrófilos sobre elas, bem como a ação do Tempol sobre esta ação microbicida (90 min.), consequentemente influenciando o número de UFC.

Figura 19. Comparação da atividade microbicida dos neutrófilos humanos contra *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) nos diferentes tempos avaliados, na presença ou ausência do Tempol.

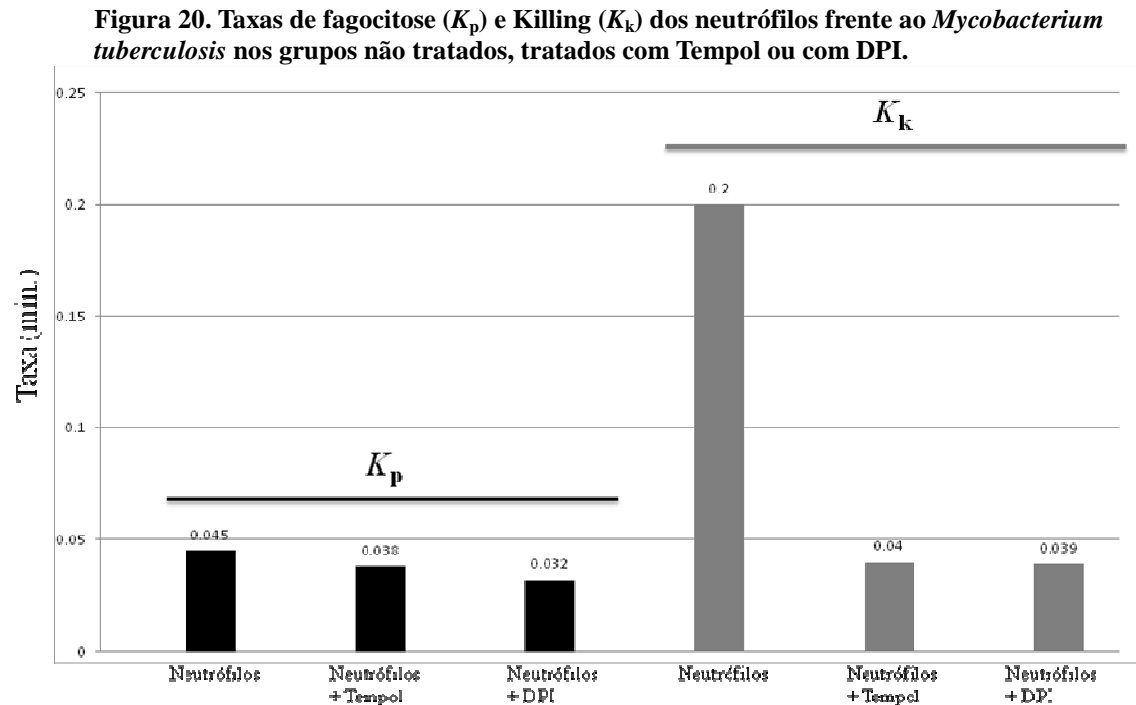


Segundo o gráfico, o número de unidades formadoras de colônias (UFCs ou *colony-forming unit* - CFU) das micobactérias extracelulares diminuem ao longo do tempo de incubação com os neutrófilos (de 10 a 90 min). Nos primeiros 30 min de análise, paradoxalmente, as UFCs de micobactérias intracelulares (linha azul) aumentam, isto porque elas estão sendo fagocitadas de modo eficiente pelos neutrófilos, mas não mortas. A partir de 30 min, o *Killing* intracelular do *M. tuberculosis* aumenta, assim as UFCs de micobactérias diminuí (linha azul). Após 90 min de incubação das micobactérias tratadas com Tempol (450 μ M), a capacidade microbicida dos fagócitos diminuiu, isto evidenciado pelo aumento do número de UFCs de *M. tuberculosis* (quadrado), ao passo que, tal tratamento, não teve influência sobre o número das micobactérias extracelulares (triângulo).

Fonte: Autor

A **Fig. 20.** mostra que o Tempol, assim como o inibidor do sistema NOX2, o DPI, um conhecido bloqueador do complexo NADPH oxidase (ELLIS et al., 1988), interferiram nas taxas de *Killing*, sem, no entanto, alterar a fagocitose. Esta capacidade do tempol em atuar na sinalização intracelular para o *Killing* de *M. tuberculosis* é marcante, de modo que não há interferência na fagocitose da micobactéria. Como observado por Francischetti et al. (2014), o efeito intracelular do Tempol é destacado, comparado a um possível efeito deste composto no espaço extracelular. Estudos tem demonstrado a importância do complexo NADPH oxidase na geração de oxidantes e, conseqüente, habilidade microbicida de fagócitos (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2011). Embora esta resposta total microbicida contra o *M.*

tuberculosis seja contrevérsia e complexa, o radical HO• parece ser um considerável agente antimicobacteriano (CATHERINE et al. 2013), não ausência de tempo hábil (tempo maior que 90 min) para a indução de iNOS e consequente formação de ERNs contra o *M. tuberculosis*.



Legenda: Como observado, o K_p não foi alterado pelo Tempol, ou pelo Diphenyleiodonium chloride (DPI) ($p > 0,05$), por outro lado, o K_k foi significativamente ($p < 0,05$) diminuído na presença de Tempol ($450 \mu M$) ou DPI ($32 \mu M$).

Fonte: Autor

A fagocitose de microrganismos opsonizados com IgG por neutrófilos tem sido descrita como ocorrendo em um tempo de até 30 s em média. Mas o tempo de maturação dos fagossomos e, as efetivas respostas microbicidas, permanecem incertas e variam de acordo com o tipo de fagócito, variações individuais e principalmente depende do estímulo empregado (NORDENFELT & TAPPER, 2011).

É aqui ressaltado que, esses resultados, não devem ser interpretados e/ou extrapolados para dados *in vivo*, com relação a um possível efeito de ação inibitória da resposta de fagócitos frente ao *M. tuberculosis*, uma vez que estudos mais avançados devem ser realizados. Como revisado por Wilcox, (2010), o Tempol não enfraquece *in vivo* a resposta microbicida contra *Pseudomonas aeruginosa*, em um modelo experimental de sepsé induzida por este microrganismo, sugerindo que este composto não altera a capacidade do organismo em responder a esta condição clínica.

Exemplificando outro efeito pró-hospedeiro do Tempol durante a resposta imune

contra patógenos, como a patogênicidade da malária envolve a geração de HO•/HO⁻ seguindo o despreendimento de ferro (Fe) dentro das hemácias (Efeitos do Tempol sobre os radicais HO•/HO⁻ e sobre o Fe⁺² são demonstrados na **Fig. 2.**), o Tempol inibe o crescimento do parasita (avaliado para o *Plasmodium berghei*) e protege as hemácias dos danos oxidativos (WILCOX, 2010). Ampliando este conceito, recentemente Francischetti et al. (2014) demonstraram que o Tempol pode proteger o hospedeiro dos danos gerados durante a malária cerebral, induzida pelo *Plasmodium berghei*, devido ao efeito antioxidante desempenhado pelo Tempol.

Por outro lado, dois efeitos do tempol que podem promover e/ou incrementar o fardo da doença infecciosa são destacados (ou seja, efeitos pró-patógenos/doenças infecciosas). Em um estudo *in vivo*, Tempol administrado oralmente por meses a camundungos infectados por *Leishmania amazonensis* foi capaz de favorecer o incremento da carga parasitária, principalmente por inibir a expressão de iNOS e, conseqüentemente, de peroxinitrito (ONOO⁻, mecanismo também descrito na **Fig. 2.**), um importante oxidante com ação anti-*Leishmania* (WILCOX, 2010). Em outro estudo, foi demonstrado que o Tempol pode aumentar a susceptibilidade do hospedeiro contra espécies de *Campylobacter*, devido à alteração das concentrações locais do O₂, que é letal para microrganismos anaeróbios (revisto em WILCOX, 2010). Como é de conhecimento, espécies do gênero *Campylobacter* não toleram ambientes com conteúdos de O₂ acima de 15 %, mas na presença de Tempol, elas podem tolerar altas concentrações de O₂ adicionadas ao meio. Assim, Wilcox, (2010) concluiu que o Tempol deve aumentar a patogenicidade de bactérias anaeróbias e de *Leishmania amazonensis* e por outro lado aumentar a resposta microbicida contra *P. berghei*.

Além disso, segundo Cuzzocrea et al. (2004), Tempol é um forte regulador de NF-κB de fagócitos durante processos inflamatórios agudos, portanto, não apenas atenuando a inflamação mediada por este multifuncional fator de transcrição, mas também, diminuindo a resposta imune em que este pleiotrópico complexo proteico toma parte. Também no que se refere à resposta via NF-κB, esta proteína acumula-se no núcleo de neutrófilos estimulados com PMA ou TNF α, participando de forma efetiva na formação de NETs (STOIBER et al., 2015).

È notório e destacado aqui o pleiotropismo do Tempol (considerado um antioxidante funcional) e, a complexidades destes diversificados efeitos sobre a resposta do hospedeiro as infecções, não apenas por atuar diretamente sobre o sistema imune, mas também sobre o balanço redox dos microrganismos e outros processos biológicos essenciais a uma plena resposta a patógenos (o que é preponderante na resposta a parasitas, por exemplo). Devido as

peculiares características do *M. tuberculosis*, como o seu comportamento como um parasita intracelular facultativo, constituição celular com alto conteúdo lipídico da parede celular, porém, com boa permeabilidade para compostos como o Tempol e outros fatores particulares a esta micobactéria, a predição *in vivo* de possíveis efeitos do Tempol sobre o sistema imune e, sobre a micobactéria, bem como o desfecho esperado sobre o balanço redox, torna-se difícil.

Adicionalmente aos mecanismos de detoxificação micobacteriano, como já discutido aqui, ou de geração de oxidantes e, aos mecanismos regulatórios do hospedeiro (via glutatona ou outros mecanismos), destaca-se a possível influência de fatores de transcrição para a ativação de sistemas de detoxificação de oxidantes e/ou pró-oxidantes do hospedeiro/micobactéria, uma vez que *M. tuberculosis* coloniza hospedeiros sem TB e a TB pode tornar-se uma doença crônica, portando propiciando tempo para indução de fatores de transcrição e posterior ativação gênica e tradução de proteínas de interesse. É também aqui destacada, a importante resposta microbicida de fagócitos contra *M. tuberculosis*, através da geração de ERNs.

De acordo com MacMicking et al. (1997), camundongos homocigotos para disrupcionados alelos de NOS2 (NOS2^[-/-]) infectados com *M. tuberculosis* tendem a ser mais suscetíveis ao desfecho TB, devido a falha em gerar peroxinitrito (ONOO⁻) e outras ERNs, bem como de enzimas com ação anti-micobacteriana que contribuem para um efetivo *Killing* de *M. tuberculosis*. Como aqui avaliado, o Tempol não apresentou atividade antimicobacteriana, durante os 90 minutos de exposição, entretanto, como este composto apresenta atividade sobre o O₂, e as micobactérias crescem melhor em meios com alta concentração de O₂ (daí elas buscarem regiões pulmonares onde a pressão parcial de O₂ é maior), talvez o Tempol possa apresentar um adicional efeito sobre o crescimento do *M. tuberculosis in vivo*. Assim, além de o Tempol ter tido efeito sobre a resposta microbicida dos neutrófilos contra o *M. tuberculosis* em 90 minutos (tempo suficiente para a fagocitose e *Killing* intracelular desta micobactéria, NORDENFELT & TAPPER, 2011), um longo prazo de interação deste composto com *M. tuberculosis* poderia diminuir o crescimento micobacteriano.

In vivo, a localização dos bacilos que podem ser extracelular, intracelular, em lesões caseosas ou na circulação sistêmica, dificulta a busca por fármacos ideais, com características físicas-químicas que possam atuar nestes diversificados meios, cujas características bioquímicas e físico-químicas são diversificadas, além da própria constituição das micobactérias (KONEMAN, 2008). Assim, um fator extra para a atuação do Tempol nos

nichos onde os fagócitos combatem as micobacterias também é um importante fator a ser considerado, além disso, *in vivo* deve ser considerado o efeito sistêmico do Tempol que, seria de grande utilidade, uma vez que como já discutido aqui, pode reverter o *status* dos danos oxidativos sistêmicos gerados pelas micobacterias, bem como da terapia anti-TB.

Embora o assunto gere uma grande controvérsia, é notório à necessidade de oxidantes para um *Killing* eficiente de *M. tuberculosis* por fagócitos. Em um estudo conduzido por Ding et al. (1988), fagócitos deficientes para uma formação plena do complexo NADPH oxidase (gp91^{phox-/-}) e conseqüentemente, para a formação de EROs, demonstraram menor capacidade de *Killing* de *M. tuberculosis*, assim como fagócitos deficientes para a expressão de iNOS (iNOS^{-/-}) e conseqüente formação de ERNs. Assim sendo, um sinergismo entre a ativação do complexo NADPH oxidase e a ativação de iNOS para um efetivo *Killing* de *M. tuberculosis* foi proposto. O tempo de incubação aqui praticado (90 min.), inviabiliza a efetiva ação de iNOS e geração de ERNs, embora permita um efetivo *killing* por EROs.

Como forma de defesa do *M. tuberculosis*, de acordo com Yuniastuti (2012), diferentes sistemas de detoxificação de EROs/ERNs produzido por fagócitos têm sido descritos, como o envolvendo KatG (*i.e.*, protege *M. tuberculosis* do *Killing* por H₂O₂), AhpC (*i.e.*, protege de ONOO⁻), Lipoarabinomanana (*i.e.*, protege de EROs em geral), SodA e SodC (*i.e.*, converte o O₂^{•-} gerado pelo sistema NADPH oxidase dos fagócitos em O₂ e H₂O₂, dessa forma, prevenindo a formação de altos níveis de H₂O₂ por outras vias ao diminuir o precursor O₂^{•-}, **Fig. 2**), proteínas tipo hemoglobinas (*haemoglobin-like proteins*, codificadas pelos genes *glbN* e *glbO*, fazem detoxificação de ERNs), tioredoxinas (*i.e.*, proteínas de 8-14 kDa que ajudam a manter outras proteínas do *M. tuberculosis* no estado reduzido) e micotiol (*i.e.*, as micobactérias são desprovidas de GSH e, como substitutos, elas produzem os micotióis [MSH], que são pseudo-dissacarídeos que contém um grupo funcional cisteína, ao lado da própria característica como uma redutora, MSH apresenta outras funções para manter a homeostase redox intracelular em *M. tuberculosis*, promovendo a defesa contra EROs).

Como aqui já observado, quanto à geração de possíveis ERNs no intervalo de 60 min avaliados para o *burst* oxidativo, para a indução do *burst* oxidativo de neutrófilos estimulados com *M. tuberculosis* no intervalo de 90 min, avaliado no ensaio de *Killing*, talvez uma quantidade satisfatória/efetiva de ERNs não sejam produzidas neste período de tempo, sendo assim, pode ser mínima a influência de ERNs na ação microbicida contra o *M. tuberculosis*, avaliada em até 90 min de incubação entre neutrófilos e *M. tuberculosis*.

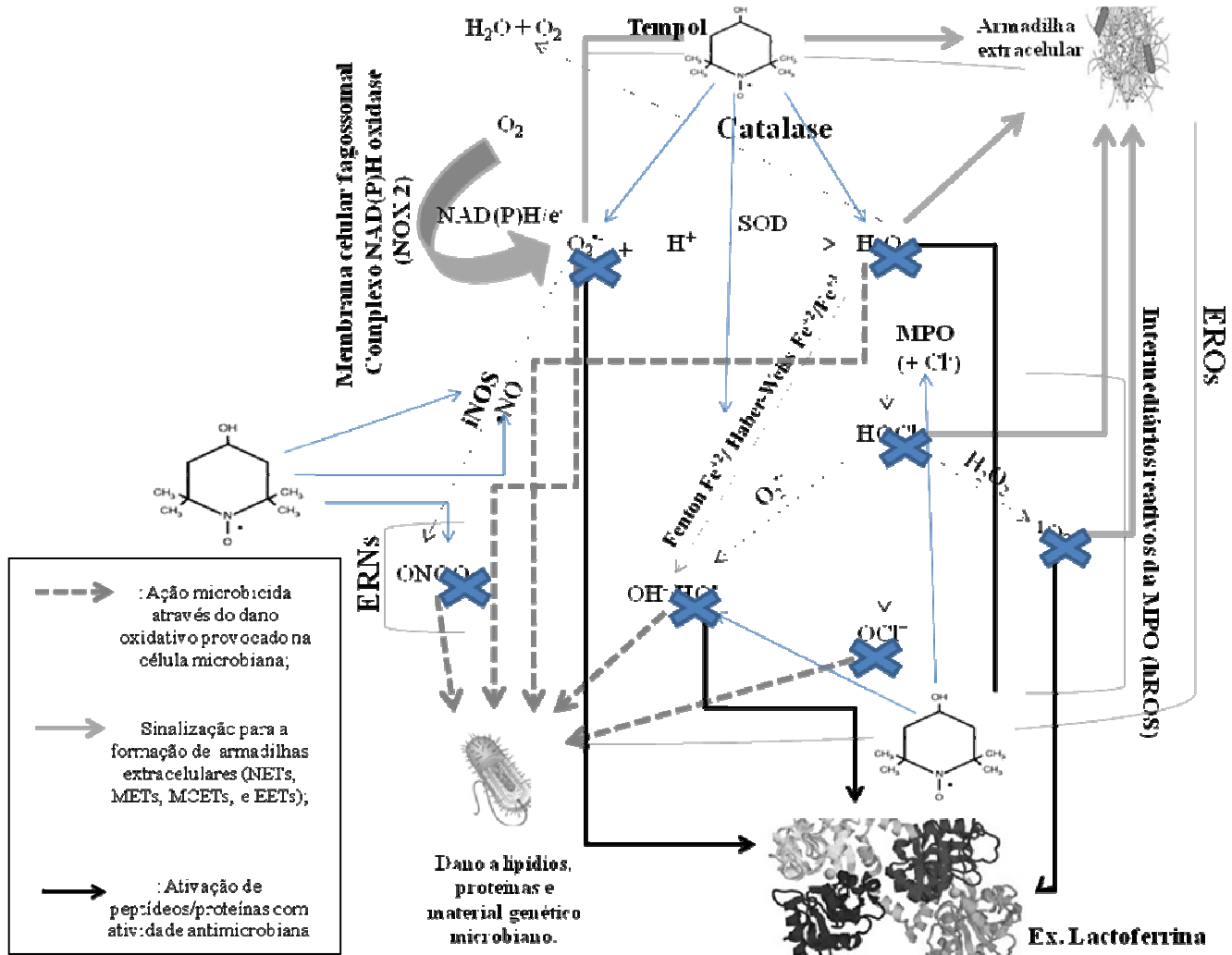
As catelicidinas (*i. e.*, LL 37, hCAP 18, CAMP) são uma família de peptídios com atividade antimicrobiana, encontradas nos lisossomos de macrófagos e neutrófilos, com

notória ação sobre *M. tuberculosis* (HAWN et al., 2013). Ainda, corroborando a hipótese de uma efetiva ação antimicobacteriana por fagócitos, independente de EROs/ERNs, Flesch & Kaufman (1988) demonstraram que, macrófagos ativado por $\text{INF}\gamma$, matam efetivamente *M. tuberculosis* de uma forma independentes dos oxidantes.

Os macrófagos, *in vivo*, tem sua ação antimicobacteriana reforçada por alguns fatores, tais como citocinas, $\text{INF}\gamma$ (aumenta a fagocitose das micobactérias), $\text{TNF}\alpha$ (aumenta o *Killing* das micobactérias) ou adicionais, tais como o calcitriol e vitamina D (reforça a fagocitose das micobactérias), desta forma, efetivamente eliminando as micobactérias. Os neutrófilos, *in vitro*, parecem também poder fagocitar e matar *M. tuberculosis*, porém, através de um mecanismo mais simples, com menor exigência de outros coadjuvantes e, esta resposta, tem sido observada por ser menos eficiente que aquela gerada pelos macrófagos, neste contexto, a efetividade quanto à importância do *Killing* das micobactérias por neutrófilos tem sido questionada, indicando que a prevalência da resposta de neutrófilos contra *M. tuberculosis* parece contribuir com os fenômenos inflamatórios da patologia TB e/ou a transição entre resposta inata e adquirida (*i.e.*, produzindo críticas citocinas), preferível à defesa do hospedeiro (DENIS, 1991; ERUSLANOV et al., 2005). Além disso, é destacada a grande mobilidade de neutrófilos, que permite uma rápida abordagem frente aos processos infecciosos, como também observado na TB, em que uma rápida migração até os pulmões são observadas (ERUSLANOV et al., 2005).

A **Figura 21.** resume os possíveis mecanismos sinalizados por EROs/ERNs, bem como os possíveis oxidantes alvos (de forma direta ou indiretamente) do Tempol. Na **Fig. 22.**, em uma sequência da **Fig. 21.**, é demonstrado o efeito do Tempol sobre os oxidantes, afetando seus *status* (por ser uma simples representação esquemática, uma noção quantitativa não é apresentada), sendo, a seguir, complementada pela **Fig. 23.**, que mostra as consequências das alterações provocadas pelo Tempol no *status* dos oxidantes intra e/ou extracelulares, repercutindo em importantes efeitos biológicos. Como exemplos, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode ativar enzimas com ação antimicobacteriana, bem como o H_2O_2 (um conhecido modulador da ativação). O $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HOCl podem auxiliar na formação de ETs. E, alguns oxidantes, podem ter ação antimicrobiana direta, como o $\text{HO}\bullet$ contra o *M. tuberculosis*.

Figura 22. Representação esquemática das espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) afetadas pelo Tempol durante a sinalização desempenhada por estes oxidantes durante a resposta microbica.



Legenda: NAD(P)H nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido; EROs/ERNs: espécies reativas do oxigênio/nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintetase induzida; MPO: mieloperoxidase; SOD: superóxido dismutase; hROS: espécies altamente reativas do oxigênio (*highly reactive oxygen species*); O₂^{•-}: ânion superóxido; ONOO•: peroxinitrito; HOCl: ácido hipocloroso; OCl⁻: anion hipoclorito; ¹O₂: oxigênio singlete; •NO: óxido nítrico; HO•: radical hidroxila; H₂O₂: peróxido de hidrogênio. Pela ação da MPO fagocítica, são formadas as hROS; X: representa inibição e/ou diminuição; Armadilhas extracelulares: NETs: armadilhas extracelular de neutrófilos (*Neutrophils extracellular traps*); METs: armadilhas extracelular de macrófagos/monócitos (*Macrophages extracellular traps*); MCETs: armadilhas extracelular da mastócitos (*Mast cells extracellular traps*); EETs: armadilhas extracelular de eosinófilos (*Eosinophils extracellular traps*).

Como mostrado na figura, os oxidantes apresentam um papel diversificado na sinalização celular para importantes eventos. Neste contexto, Tempol poderia comprometer tais mecanismos, através da ação antioxidante ou inibindo as enzimas iNOS e MPO, responsáveis pela formação de potentes oxidantes, portanto reduzindo a resposta microbica. Além disso, como alguns oxidantes tomam parte na formação de ETs e na ativação de enzimas com ação antimicrobiana, Tempol pode apresentar um efeito ainda mais notável sobre a resposta de fagócitos a patógenos.

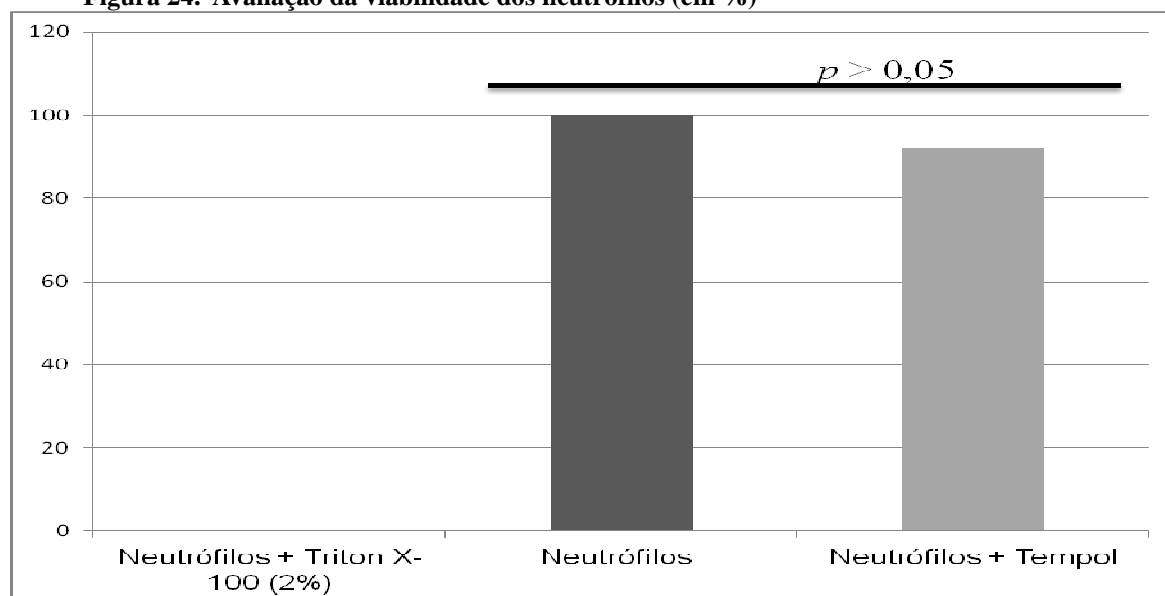
Observação: Neste esquema de representação esquemática, é apresentado uma extremamente simplificada visão geral, portanto, as reações químicas/interações não estão balanceadas.

Fonte: Autor

Atividade citotóxica do Tempol

Tendo o Tempol apresentado a capacidade de diminuir o *burst* oxidativo em neutrófilos, em um intervalo de até 3 horas, de NETs, em até 4 horas e também tendo interferido na resposta microbicida total destas células, neste estudo, não foi descartado a possibilidade de um possível efeito citotóxico deste composto. Entretanto, conforme avaliado pelo ensaio de redução do MTT, em todos os intervalos de tempos experimentais avaliados neste estudo (0 a 4 horas), Tempol a 500 μM não foi tóxico para os neutrófilos humanos (**Fig. 24.**). De acordo com Wilcox (2010), Tempol apresenta baixa toxicidade, sendo que, estudos *in vivo* mostraram que doses de 300 mg/kg/dia ou de 87 $\mu\text{M}/\text{kg}$ (tem sido também reportado como bem tolerado até 0,5 mM) são não tóxicas em ratos ou camundongos. Estes resultados demonstram que, embora Tempol possa interferir significativamente no *burst* oxidativo de neutrófilos, em até 3 horas, a viabilidade dos neutrófilos não foi afetada.

Figura 24. Avaliação da viabilidade dos neutrófilos (em %)



Legenda: As médias da porcentagem (%) de neutrófilos viáveis foram obtidas de três independentes experimentos ($n = 3$), e mostrou que o tratamento com Tempol (500 μM) não reduziu significativamente ($p > 0,05$) a viabilidade dos neutrófilos após 4 h de incubação, comparados ao grupo controle (neutrófilos não tratados com Tempol).

Fonte: Autor

6. CONCLUSÕES

O Tempol a uma concentração de 450 μM inibiu *ex vivo* o *burst* oxidativo e a de neutrófilos humanos e, conseqüentemente, a capacidade microbicida total *in vitro* destas células contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Interessantemente, este antioxidante não foi citotóxico para tais células nesta concentração. Provavelmente, a suave interferência do Tempol sobre a resposta microbicida de neutrófilos pode ser devido a uma diminuição na sinalização via oxidantes da degranulação e/ou ativação de enzimas com ação antimicobacteriana, uma vez que, pelo tempo de incubação aqui avaliado durante o ensaio de *Killing* (até 90 minutos), a ausência de ação antimicobacteriana das armadilhas extracelulares e a ausência de tempo hábil para a coordenação temporo-espacial na ativação de *iNOS* e conseqüente formação de espécies reativas do nitrogênio, apesar da formação de EROs como o HO•, conhecido agente antimicobacteriano, é provável que a ação antimicobacteriana seja fruto de enzimas com ação antimicrobianas ativadas durante o processo de degranulação sinalizadas por oxidantes, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Este estudo demonstra que antioxidantes podem interferir na resposta imune frente a patógenos como o *M. tuberculosis*. Entretanto, é destacada aqui a importância desta classe de compostos durante o tratamento da tuberculose (TB), uma vez que o dano oxidativo oriundo da terapia anti-TB pode representar um grave problema para os pacientes, inclusive risco de morte. Complementarmente, o excesso de armadilhas extracelulares geradas por fagócitos contra o *M. tuberculosis* também pode impor serias conseqüências à saúde do paciente infectado (trombose, aumento de viscosidade de fluidos e obstrução física pulmonar), assim destaca-se também mais uma utilidade clínica dos antioxidantes durante o tratamento da TB. Portanto, o uso ou não de uma terapia antioxidante adjuvante no tratamento da TB deve ser pesada cautelosamente, visando o completo bem estar do paciente.

Os possíveis efeitos *in vivo* do Tempol, em pacientes infectados pelo *M. tuberculosis* ou com TB ativa, são incertos, uma vez que, tanto efeitos locais (no pulmão) quanto sistêmicos, são relevantes, isto devido ao estresse oxidativo local e sistêmico que podem ocorrer, devido à ação do *M. tuberculosis* ou da terapia anti-TB e, também, a extrapolação é complexa devido a este *status*, que pode sofrer uma considerável variação.

Atualmente, encontra-se em curso a quantificação e visualização das armadilhas extracelulares formadas por neutrófilos tratados ou não com Tempol em resposta ao *M. tuberculosis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clin Dev Immunol**. Vol. 2011, p. 814-943, 2011.
- ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Vol. 2012, Article ID 936486, p. 14, 2012.
- ALFANDARI, S.; et al. Tuberculose spinale multifocale M6d. **Mal Infect**. Vol. 25, p. 1011-20, 1995.
- AMORIM, C. F.; SOUZA, A. S.; DINIZ, A. G.; CARVALHO, N. B.; SANTOS, S. B.; CARVALHO, E. M. Functional Activity of Monocytes and Macrophages in HTLV-1 Infected Subjects. **Negl Trop Dis**. Vol. 8, p. e339, 2014.
- ANDREYEV, A. YU.; KUSHNAREVA, YU. E.; STARKOV, A. A. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Biochemistry (Moscow)**. Vol. 70, n. 2, p. 200-214, 2005. Translated from **Biokhimiya**. Vol. 70(2), p. 246-264, 2005.
- ARAZNA, M.; PRUCHNIAK, M. P.; DEMKOW, U. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections: strategies for escaping from killing. **Respir Physiol Neurobiol**. Vol. 187, n. 1, p. 74-7, 2013.
- AUGUSTO, O.; TRINDADE, D. F.; LINARES, E.; VAZ, S. M. Cyclic nitroxides inhibit the toxicity of nitric oxide-derived oxidants: mechanisms and implications. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. Vol. 80, n. 1, p. 179-189, 2008.
- AZEVEDO, E. P. C.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; TOREZANI, G. S.; BRAGA, C. A.; et al. Amyloid fibrils trigger the release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs), causing fibril fragmentation by NET-associated elastase. **J Biol Chem**. Vol. 287, n. 44, p. 37206–37218, 2012.
- BALISH, E.; WARNER, T. F.; NICHOLAS, P. J.; PAULLING, E. E.; WESTWATER, C.; SCHOFIELD, D. A. Susceptibility of germfree phagocyte oxidase and nitric oxide synthase 2-deficient mice, defective in the production of reactive metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin. **Infection and Immunity**. Vol. 73, n. 3, p. 1313–1320, 2005.
- BARGAGLI, E.; OLIVIERI, C.; BENNETT, D.; PRASSE, A.; MULLER-QUERNHEIM, J.; ROTTOLI, P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review. **Respiratory Medicine**. Vol. 103, p. 1245e1256, 2009.
- BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? **Biochemical Pharmacology**. 2008. doi:10.1016/j.bcp.2008.11.009
- BATTIN, E. E.; BRUMAGHIM, J. L. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. **Cell Biochem Biophys**. Vol. 55, n.1, p. 1-23, 2009.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometer method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol Chem.** Vol. 195, p. 133-140, 1952.

BEITER, K.; WARTHA, F.; ALBIGER, B.; et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. **Current Biology.** Vol. 16, p. 401–407, 2006.

BENZIE, I. F. Evolution of antioxidant defence mechanisms. **Eur J Nutr.** Vol. 39, n.2, p. 53-61 2000.

BIANCHI, M.; HAKKIM, A.; BRINKMANN, V. et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. **Blood.** Vol. 114, n.13, p. 2619-22, 2009.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; AND DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology.** Vol. 12, p. 64–76, 2000.

BOKOCH, G. M.; DIEBOLD, B. A. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. **Blood.** Vol. 100, n. 8, p. 2692-2695, 2002.

BRAIAN, C.; HOGEA, V.; STENDAHL, O. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Neutrophil Extracellular Traps Activate Human Macrophages. **J Innate Immun.** Vol. 5, n. 6, 2013.

BRAMBILLA, D.; MANCUSO, C.; SCUDERI, M. R.; BOSCO, P.; CANTARELLA, G.; LEMPEREUR, L.; Di BENEDETTO, G.; PEZZINO, P.; BERNARDINI, R. The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. **Nutrition Journal.** Vol. 7, n. 29, 9 p, 2008.

BRASIL, Conselho Nacional de Saúde (CNS); Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica.** 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde/2009.

BRASIL, Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica.** 2013. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/arquivos/pdf/incidencia>. Acesso em 23 Set. 2013.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis.** Vol. 83, p. 91–97, 2003.

BREWER, A. C.; MUSTAFI, S. B.; MURRAY, T. V. A.; RAJASEKARAN, N. S.; BENJAMIN, I. J. Reductive stress linked to small HSPs, G6PD, and Nrf2 pathways in heart disease. **Antioxidants & Redox Signaling.** Vol. 18, n. 9, p. 1114–1127, 2013.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science.** Vol. 303, p. 1532–5, 2004.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? **J Cell Biol.** Vol. 198, n. 5, p. 773-83, 2012.

BRIVIBA, K.; KLOTZ, L.; SIES, H.; Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. **Biol Chem.** Vol. 378, n. 11, p. 1259-65, 1997.

BROWN, A. J. P.; HAYNES, K.; QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology.** Vol. 12, p. 384–391, 2009.

BROWN D.I, GRIENGLING K.K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radic Biol Med.** Vol. 47, p.1239–53, 2009.

BRYNILDSEN, M. P.; WINKLER, J. A.; SPINA, C. S.; MACDONALD, I. C.; COLLINS, J. J. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. **Nature Biotechnology.** Vol. 31, n. 2, 2013.

BUSTAMANTE, J. et al. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. **Nature Immunology.** Vol. 12 , n. 3, 2011.

BUTOV, D. O.; KUZHKO, M. M.; KUZNETSOVA, I. M.; GRINISHINA, O. O.; MAKSIMENKO, O. A.; BUTOVA, T. S.; KALMYKOVA, I. M. Dynamics of Oxidant-antioxidant System in Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis Receiving Anti-mycobacterial Therapy. **J Pulm Respir Med.** Vol. 3, n. 5, p. 161, 2013.

BYRD, A. S.; O'BRIEN, X. M.; JOHNSON, C. M.; LAVIGNE, L. M.; REICHNER, J. S. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *C. albicans*. **J Immunol.** Vol. 190, n. 8, p. 4136–4148, 2013.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **The FASEB Journal.** Vol. 13 n. 9, p. 1007-1024, 1999.

CARSWELL, F.; ROBINSON, D. W.; WARD, C. C. L.; WATERFIELD, M. R.; “Deoxyribonucleic acid output in the sputum from cystic fibrosis patients,” **European Journal of Respiratory Diseases.** Vol. 65, n. 1, p. 53–57, 1984.

CATHERINE, V.; TRAVIS, H.; WEINRICK, B.; JACOBS Jr, W. R. *Mycobacterium tuberculosis* is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. **Nature Communications.** Vol. 4, Article number:1881, 2013.

CHANDRA, S. Bacteria: drug resistance spreads, but few new drugs emerge. **Chemistry & Biology.** Vol. 17, p. 413–414, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Treatment of Tuberculosis, American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America. **MMWR Recomm Rep.** Vol. 52 (RR11), p. 1-77, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Plan to combat extensively drug-resistant tuberculosis: recommendations of the Federal Tuberculosis Task Force. **MMWR Recomm Rep**. Vol. 13, n. 58, p. 1-43, 2009.

CHANDEL, N. S.; BUDINGER, G. R. S. The Good and the Bad of Antibiotics. **Science Translational Medicine**. Vol. 5, Issue 192, 2013.

CHEN R, KANG R, FAN X-G, TANG D. Release and activity of histone in diseases. **Cell Death and Disease**. Vol. 5, e1370, 2014.

CHOI, J-A.; LIM, Y-J.; CHO, S-N.; et al. Mycobacterial HBHA induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through the generation of reactive oxygen species and cytosolic Ca²⁺ in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Cell Death and Disease**. Vol. 4, p. e957, 2013.

COHEN, H. J.; CHOVANIEC, M. E. Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocyte. A basis for continuous assay for monitoring superoxide production for the study of the activation of the generation system. **J Clin Invest**. Vol. 61, p.1081-1087, 1978.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**. Vol. 393, p. 537–544, 1998.

CONVERSE PJ, DANNENBERG AM Jr, ESTEP JE, et al. Cavitory tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli. **Infect Immun**. Vol. 64, p. 4776–87, 1996.

COOK, N. R.; ALBERT, C. M.; GAZIANO, J. M. et al. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta-carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. **Arch Intern Med**. Vol. 167, p. 1610–18, 2007.

CHENG, O. Z.; PALANIYAR, N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. **Front Immunol**. Vol. 24, p. 4, 2013.

CIZ, M.; DENEV, P.; KRATCHANOVA, M.; et al. Flavonoids Inhibit the Respiratory Burst of Neutrophils in Mammals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Volume 2012, Article ID 181295, 6 pages, 2012.

COOPER, P. R.; PALMER, L. J.; CHAPPLE, I. L. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? **Periodontol 2000**. Vol. 63, n. 1, p. 165-97, 2013.

CRESWELL, J.; SAHU, S.; SACHDEVA, K. S.; DITIU, L.; BARREIRA, D.; MARIANDYSHEV, A.; MINGTINGE, C.; PILLAY, Y. Tuberculosis in BRICS: challenges and opportunities for leadership within the post-2015 agenda. **Bull World Health Organ**. Vol. 92, n. 6, p. 459–460, 2014.

CUSCELA, D.; COFFIN, D.; LUPTON, G. P.; COOK, J. A.; KRISHNA, M. C.; BONNER, R. F.; MITCHELL, J. B. Protection from radiation-induced alopecia with topical application of nitroxides: fractionated studies. **Cancer J Sci Am**. Vol. 2, n. 5, p. 273-8, 1996.

- CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; PATEL, N. S.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. 2004. Tempol reduces the activation of nuclear factor-kappaB in acute inflammation. **Free Radic Res.** Vol. 38, p. 813–819.
- CUZZOCREA, S. et al. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. **European Journal of Pharmacology.** Vol. 390, p. 209–222, 2000.
- CYWES, C.; GODENIR, N.; HOPPE, H. C.; SCHOLLE, R. R.; STEYN, M.; KIRSCH, R. E.; EHLERS, A. R. W. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in chinese hamster ovary cells. **Infection and Immunity.** Vol. 64, n. 12, p. 5373–5383, 1996.
- DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. C. N.; PICON, P. D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Rev. Saúde Pública.** Vol. 41, n. 1, p. 8, 2007.
- DAHLGREN, C.; KARLSSON, A.; BYLUND, J. Measurement of respiratory burst products generated by Professional phagocytes. **Methods in Molecular Biology.** Vol. 412, p. 349-364, 2007.
- DAO, D. N.; KREMER, L.; GUÉRARDEL, Y.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* Lipomannan Induces Apoptosis and Interleukin-12 Production in Macrophages. **Infection and Immunity.** Vol. 72, n. 4, p. 2067–2074, 2004.
- DARWICHE, N.; ABOU-LTEIF, G.; BAZARBACHI, A. Reactive oxygen species mediate N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced cell death in malignant T cells and are inhibited by the HTLV-I oncoprotein Tax. **Leukemia.** Vol. 21, p. 261–269, 2007.
- D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology.** Vol. 8, p. 813, 2007.
- DENIS, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. **Cell Immunol.** Vol. 132, p. 150–157, 1991.
- DELBOSC, S.; ALSAC, J-M.; JOURNE, C.; LOUEDEC, L.; CASTIER, Y.; BONNAURE-MALLET, M.; et al. *Porphyrromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation: proof of concept in rats. **PLoS ONE.** Vol. 6, n. 4, p. e18679, 2011.
- DENIS, M. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. **Clin. exp. Immunol.** Vol. 84, p. 200-206, 1991.
- DHANDAYUTHAPANI, S.; ZHANG, Y.; MUDD, M. H.; DERETIC, V. Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria: characterization and inducibility of ahpC by peroxides in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aurum* and *M. tuberculosis*. **J Bacteriol.** Vol. 178, p. 3641–3649, 1996.

- DING, A.; NATHAN, C.; STUEHR, D. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.** Vol. 141, p. 2407–2412, 1988.
- DOUDA, D. N.; GRASEMANN, H.; PACE-ASCIAK, A. C.; PALANIYAR, N. “A Lipid Mediator Hepoxilin A3 Is a Natural Inducer of Neutrophil Extracellular Traps in Human Neutrophils,” **Mediators of Inflammation.** Vol. 2015, Article ID 520871, 7 pages, 2015.
- DUDA, T. et al. Ca^{2+} sensor S100 β -modulated sites of membrane guanylate cyclase in the photoreceptor-bipolar synapse. **The EMBO Journal.** Vol. 21, n. 11, p. 2547-2556, 2002.
- DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current Opinion in Microbiology.** Vol. 12, p. 482–489, 2009.
- DYE, C.; SCHEELE S.; DOLIN P.; PATHANIA V.; RAVIGLIONE M. C. Global burden of tuberculosis: estimate of incidence, prevalence, and mortality by country. **JAMA.** Vol. 282, p. 677-86, 1999.
- DYE, C.; WILLIAMS, B. G. The population dynamics and control of tuberculosis. **Science.** Vol. 328, p. 856 – 861, 2010.
- EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. **Cell Microbiol.** Vol. 11, p. 1170-8, 2009.
- EL HAFEZ, A. A. Could Neutrophil Extracellular Traps Elucidate the Mysteries of Pathogenesis? **J Clin Exp Pathol.** Vol. 4, p. 174, 2014.
- ELKINGTON, P. T.; D'ARMIENTO, J. M.; FRIEDLAND, J. S. Tuberculosis Immunopathology: The Neglected Role of Extracellular Matrix Destruction. **Sci Transl Med.** Vol. 3, n. 71, p. 71ps6, 2011.
- ELLIOTT, M. R. et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. **Nature.** Vol. 461, p. 282–286, 2009.
- ELLIS, J. A.; MAYER, S. J.; JONES, O. T. G. The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. **Biochem. J.** Vol. 251, p. 887-891, 1988.
- ERMAKOV AV, KONKOVA MS, KOSTYUK SV, IZEVSKAYA VL, BARANOVA A, VEIKO NN. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** Vol. 2013(Article ID 649747), 12 pages, 2013.
- ERNST, J. D. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity.** Vol. 66, n. 4, p. 1277–1281, 1998.
- ERUSLANOV, E. B.; LYADOVA, I. V.; KONDRATIEVA, T. K.; et al. Neutrophil Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Genetically Susceptible and Resistant Mice. **Infection and Immunity.** Vol. 73, n. 3, p. 1744–1753, 2005.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. **Nature Reviews, Microbiology**. Vol. 2, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**. Vol. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FLEISCHMANN, R. D.; ALLAND, D.; EISEN, J. A.; CARPENTER, L.; WHITE, O.; PETERSON, J.; DEBOY, R.; DODSON, R.; GWINN, M.; HAFT, D.; HICKEY, E.; KOLONAY, J. F.; NELSON, W. C.; UMayAM, L. A.; ERMOLAEVA, M.; SALZBERG, S. L.; DELCHER, A.; UTTERBACK, T.; WEIDMAN, J.; KHOURI, H.; GILL, J.; MIKULA, A.; BISHAI, W.; JACOBS JR, W. R. JR.; VENTER, J. C.; FRASER, C. M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. **J Bacteriol**. Vol. 184, n. 19, p. 5479-90, 2002.

FLESCH, I. E. A; KAUFMAN, S. H. E. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. **Infect. Immun**. Vol. 56, p. 1464, 1988.

FORRELLAD, M. A.; KLEPP, L. I.; GIOFFRÉ, A.; et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**. Vol. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; GORDON, E.; BIZZARRO, B.; GERA, N.; ANDRADE, B. B.; et al. Tempol, an Intracellular Antioxidant, Inhibits Tissue Factor Expression, Attenuates Dendritic Cell Function, and Is Partially Protective in a Murine Model of Cerebral Malaria. **PLoS ONE**. Vol. 9, n. 2, p. e87140, 2014.

FRANCIS, R. J.; BUTLER, R. E.; STEWART, J. R. *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 is a leukocidin causing Ca²⁺ influx, necrosis and neutrophil extracellular trap formation. **Cell Death and Disease**. Vol. 5, p. e1474, 2014.

FRIGUI, W.; BOTTAI, D.; MAJLESSI, L.; Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 Secretion and Specific T Cell Recognition by PhoP. **PLoS Pathogens**. Vol. 4, n. 2, p. e33, 2008.

FRY, T. J.; MACKALL, C. L. Interleukin-7: from bench to clinic. **Blood**. Vol. 99, n. 11, p. 3892-904, 2002.

FUCHS, T. A.; ABED, U.; GOOSMANN, C. et al. Novel cell death pro-gram leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**. Vol. 176, p.231–41, 2007.

GABRIEL, C.; MCMASTER, W. R.; GIRARD, D.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J Immunol**. Vol. 185, p. 4319–27, 2010.

GANGULY N et al. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. **Tuberculosis**. Vol. 88, p. 510-517, 2008.

GANGULY, N. et al. *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF-κB transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. **Immunology and Cell Biology**. Vol. 86, p. 98–106, 2008.

GARCÍA-RODRÍGUEZ J. F. et al. Tuberculosis cutánea: estudio descriptivo de 15 años. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. Vol. 26, n. 4, p. 205-11, 2008.

GLAISSBERG V. The threat of multidrug resistance: is tuberculosis ever untreatable or uncontrollable? **Lancet**. Vol. 353, p. 998-999, 1999.

GOLDMANN, O.; MEDINA, E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. **Frontiers in Immunology**. Vol. 3, p. 1-10, 2013.

GONZALO-ASENSIO, J.; Soto, C. Y.; Arbués, A.; et al. The *Mycobacterium tuberculosis* *phoPR* Operon Is Positively Autoregulated in the Virulent Strain H37Rv. **Journal of Bacteriology**. Vol. 190, n. 21, p. 7068–7078, 2008.

GRABCANOVIC-MUSIJA, F.; OBERMAYER, A.; STOIBER, W.; et al. Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. **Respiratory Research**. 2015. p. 16:59, 2015.

GRAY, R. D.; LUCAS, C. D.; MACKELLAR, A.; Li, F.; HIERSEMENZEL, K.; HASLETT, C.; DAVIDSON, D. J.; ROSSI, A. G. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. **Journal of Inflammation**. Vol. 10, p. 12, 2013.

GREEN, J. N.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Analysis of neutrophil bactericidal activity. **Methods Mol Biol**. Vol 412, p. 319-332, 2007.

GRIMBLE, R. F. Malnutrition and the immune response. Impact of nutrients on cytokine biology in infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. Vol. 88, p. 615-619, 1994.

GRODSTEIN, F.; KANG, J. H.; GLYNN, R. J.; COOK, N. R.; GAZIANO, J. M. A randomized trial of beta-carotene supplementation and cognitive function in men: the Physicians' Health Study II. **Arch Intern Med**. Vol. 167, p. 2184–90, 2007.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidants in the skin: applications and evaluation of their efficacy. **Quim. Nova**. Vol. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GUPTA, A. K.; JOSHI, M. B.; PHILIPPOVA, M.; et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. **FEBS Letters**. Vol. 584, p. 3193–3197, 2010.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants in nutrition, health, and disease. **New York: Oxford University Press**. 1994.

HAKKIM, A.; FUCHS, T. A.; MARTINEZ, N. E.; HESS, S.; PRINZ, H.; ZYCHLINSKY, A.; WALDMANN, H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nat Chem Biol**. Vol. 7, n. 2, p. 75-7, 2011.

HALLIWELL, B. **Free Rad Res**. Vol. 31, n. 4, p. 261-72, 1999.

HALVERSON, T. W.; WILTON, M.; POON, K. K.; PETRI, B.; LEWENZA, S. DNA is an

antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. **PLoS Pathog.** Vol. 11, n. 1, p. e1004593, 2015.

HAMMER MC, BALTCH AL, SUTPHEN NT, SMITH RP, CONROY JV. *Pseudomonas aeruginosa*: quantitation of maximum phagocytic and bactericidal capabilities of normal human granulocytes. **J Lab Clin Med.** Vol. 98, p. 938–948, 1981.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. **Infection and Immunity.** Vol. 64, n. 9, p. 3512-17, 1996.

HANCOCK, J. T. The Role of Redox Mechanisms in Cell Signalling. **Mol Biotechnol.** Vol. 43, p. 162–166, 2009.

HAHN, S.; GIAGLIS, S.; CHOWDURY, C. S.; HÖSLI, I.; HASLER, P. Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infectious agents and underlying host physiology. **Semin Immunopathol.** Vol. 35, p. 439–453, 2013.

HARVARD UNIVERSITY. **Antioxidants: Beyond the Hype**, Disponível em: <http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/antioxidants/>. Acesso em: 14 Out. 2013.

HATANAKA, E. et al. Systematic study on ROS production induce by oleic, linoleic, and γ -linoleic acids in human and rat neutrophils. **Free Radicals Biology & Medicine.** Vol. 41, p. 1124-1132, 2006.

HAWN, T. R.; MATHESON, A. I.; MALEY, S. N.; et al. Host-Directed Therapeutics for Tuberculosis: Can We Harness the Host? **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** Vol. 77, n. 4, p. 608–627, 2013.

HERRERA-LEÓN, L.; POZUELO-DÍAZ, R.; MORENO, T. M.; COBACHO, A. V.; PILAR, S. V.; PAJARES, M. S. J. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** Vol. 27, n. 9, p. 496-502, 2009.

HERCBERG, S.; EZZEDINE, K.; GUINOT, C. et al. Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. **J Nutr.** Vol. 137, p. 2098-105, 2007.

HESTIVIC, A. L.; HMANA, Z.; AV-GAY, Y. *Mycobacterium* manipulation of the host cell. **FEMS Microbiol.** Vol. 29, n. 5, p. 1041-1050, 2005.

HOSSEINZADEH, A.; MESSER, P. K.; URBAN, C. F. Stable redox-cycling nitroxide Tempol inhibits NET formation. **Front Immunol.** Vol. 3, p. 391, 2012.

HU, Y.; COATES, A. R. M. Acute and Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Infections Depend on the Thiol Peroxidase TPX. **PLoS ONE.** Vol. 4, n. 4, p. e5150, 2009.

ITAGAKI, K.; KACZMAREK, E.; LEE, Y. T.; TANG, T.; ISAL, B.; ADIBNIA, Y.; SANDLER, N.; GRIMM, M. J.; SEGAL, B. H.; OTTERBEIN, L. E.; HAUSER, C. J. Mitochondrial DNA Released by Trauma Induces Neutrophil Extracellular Traps. **PLoS ONE.** Vol. 10, n. 3, p. e0120549, 2015.

ITAKURA, A.; McCARTY, O. J. T. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. **Am J Physiol Cell Physiol**. Vol. 305, p. 348–354, 2013.

JACKSON, T. C.; MI, Z.; JACKSON, E. K. Modulation of Cyclic AMP Production by Signal Transduction Pathways in Preglomerular Microvessels and Microvascular Smooth Muscle Cells. **The Journal of pharmacology and experimental Therapeutics**. Vol. 310, n. 1, p. 349–358, 2004.

JENNER, A.; ENGLAND, T. G.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Measurement of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry: ethanethiol prevents artifactual generation of oxidized DNA bases. **Biochem J**. Vol. 331, p. 365–369, 1998.

JOMOVA, K.; VONDRAKOVA, D.; LAWSON, M.; VALKO, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Mol Cell Biochem**. Vol. 345, p. 91–104, 2010.

JUNEAU RA, PANG B, WEIMER KE, ARMBRUSTER CE, SWORDS WE. Nontypeable *Haemophilus influenzae* initiates formation of neutrophil extracellular traps. **Infect Immun**. Vol. 79, p. 431–8, 2011.

KALGHATGI, S. et. al. Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. **Sci Transl Med**. Vol. 5, Issue 192, 192ra85, 2013.

KAPLAN, M. J.; RADIC, M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. **The Journal of Immunology**. Vol. 189 n. 6, p. 2689–2695, 2012.

KAWASAKI, H.; IWAMURO, S. Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. **Infect Disord Drug Targets**. Vol. 8, p. 195–205, 2008.

KESHARI, R. S.; VERMA, A.; BARTHWAL, M. K.; DIKSHIT, M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. **J Cell Biochem**. Vol. 114, n. 3, p. 532–40, 2013.

KEREN, I.; WU, Y.; INOCENCIO, J.; MULCAHY, L.R. AND LEWIS, K. Killing by Bactericidal Antibiotics Does Not Depend on Reactive Oxygen Species. **Science**. Vol 339, Issue 1213, 2013.

KIM, J. J.; LEE, S. B.; PARK, J. K.; YOO, YD. TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X_L. **Cell Death and Differentiation**. Vol. 17, p. 1420–1434, 2010.

KIRCHNER, T.; HERMANN, E.; MÖLLER, S.; et al. “Flavonoids and 5-Aminosalicylic Acid Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps,” **Mediators of Inflammation**. vol. 2013, Article ID 710239, 14 pages, 2013.

KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L. A. B.; et al. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**. Volume 2011, Article ID 405310, 12 pages, 2011.

KON, T.; TANIGAWA, T.; HAYAMIZU, K.; et al. Singlet oxygen quenching activity of

human serum. **Redox Rep.** Vol. 9, n. 6, p. 325-330, 2004.

KONEMAN, E. W.; et al. **Diagnóstico Microbiológico.** Rio de Janeiro: Ed. Guanabara koogan. 2008.

KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. von.; CHOW, O.; GHOCHANI, M.; NIZET, V. Visualization and Functional Evaluation of Phagocyte Extracellular Traps. **Methods in Microbiology.** Vol. 37, p. 139-160, 2010.

LARI, N.; RINDI, L.; GARZELLI, C. Identification of one insertion site of IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and analysis of the RvD2 deletion in *M. tuberculosis* clinical isolates. **J Med Microbiol.** Vol. 50, p. 805–811, 2001.

Le BRAS, M.; CLÉMENT, M. V.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. **Histol Histopathol.** Vol. 20, p. 205-220, 2005.

LEE, I. M.; COOK, N. R.; GAZIANO, J. M. et al. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. **JAMA.** Vol. 294, p.56–65, 2005.

LEIJH, P. C.; VAN DEN BARSELAAR, M. T.; VAN ZWET, T. L.; DUBBELDEMAN-REMPT, I.; VAN FURTH, R. Kinetics of phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes. **Immunology.** Vol. 37, p. 453–465, 1970.

LI, P.; LI, M.; LINDBERG, M. R.; KENNETT, M. J.; XIONG, N.; WANG, Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. **J Exp Med.** Vol. 207, p. 1853–62, 2010.

LI, Y.; KARLIN, A.; LOIKE, J. D.; SILVERSTEIN, S. C. A critical concentration of neutrophils is required for effective bacterial killing in suspension. **PNAS.** Vol. 99, n. 12, p. 8289 – 8294, 2002.

LIU, Y.; AND IMLAY, J. A. Cell Death from Antibiotics Without the Involvement of Reactive Oxygen Species. **Science.** Vol 339, Issue 12, 2013.

LONN, E.; BOSCH, J.; YUSUF, S. et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. **JAMA.** Vol. 293, p.1338–47, 2005.

LONNROTH, K.; JARAMILLO, E.; WILLIAMS, B. G.; DYE, C.; RAVIGLIONE, M. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. **Soc. Sci. Med.** Vol. 68, p. 2240–2246, 2009.

LUNDQVIST, H.; DAHLGREN, C. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. **Free Radical Biology & Medicine.** Vol. 20, p. 785-792, 1995.

LU, T.; KOBAYASHI, S. D.; QUINN, M. T.; DELEO, F. R. A NET outcome. **Frontiers in Immunology.** Vol. 3, Article 365, 9 pages, 2012.

MACIP, S. et al. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. **The EMBO Journal**. Vol. 21, n. 9, p. 2180-2188, 2002.

MACMICKING, J. D.; NORTH, R. J.; LACOURSE, R.; MUDGETT, J. S.; SHAH, S. K.; NATHAN, C. F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Vol. 94, n. 10, p. 5243-8, 1997.

MALACHOWA, N.; KOBAYASHI, S. D.; FREEDMAN, B.; DORWARD, D. W.; DELEO, F. R. *Staphylococcus aureus* leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. **J Immunol**. Vol. 191, n. 12, p. 6022-9, 2013.

MANDA, G.; NECHIFOR, M. T.; NEAGU, T-M. Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. **Current Chemical Biology**. Vol. 3, p. 342-366, 2009.

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**. Vol. 11, p. 519-531, 2011.

MAQBOOL, M.; VIDYADARAN, S.; GEORGE, E.; RAMASAMY, R. Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. **Med J Malaysia**. Vol. 66, n. 4, p. 296-9, 2011.

MARCH 24, World TB Day. **TB & HIV**. Vol. 10, p. 2, 1996.

MARCOS, V.; ZHOU-SUCKOW, Z.; YILDIRIM, A. O.; et al. "Free DNA in Cystic Fibrosis Airway Fluids Correlates with Airflow Obstruction," **Mediators of Inflammation**. vol. 2015, Article ID 408935, 11 pages, 2015.

MARTÍNEZ, M. C.; AND ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**. Vol. 11, n. 3, p. 669-702, 2009.

MATSUDA, T.,; SAITO, H.; INOUE, T.; FUKATSU, K.; LIN, M. T.; HAN, I.; FURUKAWA, S.; IKEDA, S.; MUTO, T. Ratio of bacteria to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) determines PMN fate. **Shock**. Vol. 12, n. 5, p. 365-72, 1999.

MAY, M. E.; SPAGNUOLO, P. J. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with Mycobacterium Tuberculosis. **Infect Immun**. Vol. 55, p. 2304-2307, 1987.

MCINTURFF, A. M.; CODY, M. J.; ELLIOTT, E. A.; GLENN, J. W.; ROWLEY, J. W.; RONDINA, M. T.; YOST, C. C. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 α . **Blood**. Vol. 120, n. 15, p. 3118-25, 2012.

MEAGHER, E.; RADER, D. J. Antioxidant Therapy and Atherosclerosis: Animal and Human Studies. **TCM**. Vol. 9, n. 3/4, 2001.

MEDINA, E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. **J Innate Immun.** Vol. 1, n. 3, p. 176-80, 2009.

MELONI-BRUNERI LH.; CAMPA, A.; ABDALLA, D. S.; CALICH, V. L.; LENZI, H. L.; BURGER, E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **Journal of Leukocyte Biology.** Vol. 59, n. 4, p.526-33, 1996.

METZLER, KD.; FUCHS, T. A.; NAUSEEF, W. M. et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood.** Vol. 117, p. 953-9, 2010.

MILLER, B. F.; ABRAMS, R.; DORFMAN, A.; KLEIN, M. Antibacterial Properties of Protamine and Histone. **Science.** Vol. 96, p. 428-430, 1942.

MOHAMMED, B. M.; FISHER, B. J.; KRASKAUSKAS, D.; FARKAS, D.; BROPHY, D. F.; FOWLER III, A. A.; NATARAJAN, R. Vitamin C: A Novel Regulator of Neutrophil Extracellular Trap Formation. **Nutrients.** Vol. 5, p. 3131-3150, 2013.

MOHAMMADI, Z.; SHALAVI, S. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite in endodontics. **J Mass Dent Soc.** Vol. 62, n. 1, p. 28-31, 2013.

MORRIS, D.; NGUYEN, T.; KIM, J.; et al. An Elucidation of Neutrophil Functions against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clinical and Developmental Immunology.** Volume 2013, Article ID 959650, 11 pages.

MORONES-RAMIREZ.; et al. Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria. **Sci Transl Med.** Vol 5, Issue 190, p. 190ra81, 2013.

NAUSEEF, W. M. **Isolation of human neutrophils from venous blood. In Neutrophils Methods and Protocols.** Mark T. Quinn, Frank R. DeLeo, Gary M. Bokoch. Human Press Inc.: Totowa, pp.15-34, 2008.

NAUSEEF, W. M. Nyetto NETs? A pause for healthy skepticism. **Journal of Leukocyte Biology.** Vol. 91, p. 353-355, 2012.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews, Immunology.** Vol 13, p. 349, 2013.

NEUFERT, C.; PAI, R. K.; NOSS, E. H.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa Lipoprotein Promotes Neutrophil Activation. **J Immunol.** Vol. 167, p. 1542-1549, 2001.

NEYROLLES, O; GUILHOT, C. Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. **Tuberculosis.** Vol. 91, p. 187-195, 2011.

NISHINAKA, Y.; ARAI, T.; ADACHI, S.; TAKAORI-KONDO, A.; AND YAMASHITA, K. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol. 413, p. 75-79, 2011.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils.

Journal of Leukocyte Biology. Vol. 90, p. 271-284, 2011.

OLIVEIRA-JUNIOR, E. M.; BUSTAMANTE, J.; NEWBURGER, P. E.; CONDINO-NETO, A. The Human NADPH Oxidase: Primary and Secondary Defects Impairing the Respiratory Burst Function and the Microbicidal Ability of Phagocytes. **Scandinavian Journal of Immunology.** Vol. 73, p. 420–427, 2011.

OMENN, G. S.; GOODMAN, G. E.; THORNQUIST, M. D. et al. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **N Engl J Med.** Vol. 334, p. 1150-55, 1996.

PARSEGHIAN, M. H.; LUHRS, K. A. Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. **Biochem Cell Biol.** Vol. 84, p. 589-604, 2006.

PERSKVIST, N.; ZHENG, L.; STENDAHL, O. Activation of Human Neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra Involves Phospholipase Cg2, Shc Adapter Protein, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. **J Immunol.** Vol. 164, p. 959-965, 2000.

PODMORE, I. D.; GRIFFITHS, H. R.; HERBERT, K. E.; et al. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature.** Vol. 392, p. 559, 1998.

POIRIER, A. C.; SCHMITT, P.; ROSA, R. F.; et al. Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. **J. Biol. Chem.** 18 p, 2014.

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? **Antioxidants & Redox Signaling.** Vol. 20, n. 6, p.1000-1037, 2014.

PALMER, L. J.; COOPER, P. R.; LING, M. R.; WRIGHT, H. J.; HUISSOON, A. CHAPPLE, I. L. C. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. **Clinical and Experimental Immunology.** Vol.167, p. 261–268, 2012.

PAPAYANNOPOULOS, V.; METZLER, K. D.; HAKKIM, A.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol.** Vol. 191, p. 677–91, 2010.

PEDROSO, E. R. P.; ROCHA, M. O. C.; Infecções emergentes e reemergentes. **Rev Med MG.** Vol. 19, n. 2, p. 140-150, 2009.

PERSSON, Y. A.; BLOMGRAN-JULINDER, R.; RAHMAN, S.; ZHENG, L.; STENDAHL, O. *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils trigger a pro-inflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, act-ing in synergy with the bacteria. **Microbes Infect.** Vol. 10, p. 233–240, 2008.

PERSSON, A.; BLOMGRAN-JULINDER, R.; EKLUND, D.; LUNDSTROM, C.; STENDAHL, O. Induction of apoptosis in human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis* dependent on mature bacterial lipoproteins. **Microb Pathog.** Vol. 47, p. 143–150, 2009.

- PILETTE, C.; OUADRHIRI, Y.; VAN SNICK, J.; RENAULD, J. C.; STAQUET, P.; VAERMAN, J. P.; SIBILLE, Y. Oxidative burst in lipopolysaccharide-activated human alveolar macrophages is inhibited by interleukin-9. **Eur Respir J**. Vol. 20, n. 5, p. 1198-205, 2002.
- PILSCZEK, F. H.; SALINA, D.; POON, K. K. et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. **J Immunol**. Vol. 185, p. 7413–25, 2010.
- POKKALI, S.; RAJAVELU, P.; SUDHAKAR, R.; DAS, S. D. Phenotypic modulation in *Mycobacterium tuberculosis* infected neutrophil during tuberculosis. **Indian J Med Res**. Vol. 130, p. 185-192, 2009.
- RÁC, M.; KŘUPKA, M.; BINDER, B.; SEDLÁŘOVÁ, M.; MATUŠKOVÁ, Z.; RAŠKA, M.; POSPÍŠIL, P. Oxidative Damage of U937 Human Leukemic Cells Caused by Hydroxyl Radical Results in Singlet Oxygen Formation. **PLoS One**. Vol. 10, n. 3, p. e0116958, 2015.
- RADA, B.; JENDRYSIK, M. A.; PANG, L.; HAYES, C. P, YOO, D-G; PARK, J. J.; et al. Pyocyanin-Enhanced Neutrophil Extracellular Trap Formation Requires the NADPH Oxidase. **PLoS ONE**. Vol. 8, n. 1, p. e54205, 2013.
- RADIC, M.; KAPLAN, M. J. Extracellular Chromatin Traps Interconnect Cell Biology, Microbiology, and Immunology. **Frontiers in Immunology**. Vol. 4, p. 160, 2013.
- RAGÀS, X.; HE, X.; AGUT, M.; ROXO-ROSA, M.; GONSALVES, A. R.; SERRA, A. C.; NONELL, S. Singlet Oxygen in Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Molecules**. Vol. 18, n. 3, p. 2712-2725, 2013.
- RAMOS-KICHIK, V.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; MONDRAGÓN-CASTELÁN, M.; GONZALEZ-POZOS, S.; et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**. Vol. 89, p. 29–37, 2009.
- REDDY, Y. N.; MURTHY, S. V.; KRISHNA, D. R.; PRABHAKAR, M. C. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. **Indian J Tuberc**, v. 51, p. 213-218, 2004.
- REGOLI, S.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**. 2013, doi: 10.1016/j.marenvres.2013.07.006.
- REMIJSEN, Q.; VANDEN BERGHE, T.; WIRAWAN, E.; et al. Neutrophil extra-cellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. **Cell Res**. Vol. 21, p. 290–304, 2011.
- REPASY, T.; LEE, J.; MARINO, S.; et al. Intracellular Bacillary Burden Reflects a Burst Size for *Mycobacterium tuberculosis* *In Vivo*. **PLoS Pathog**. Vol. 9, n. 2, p. e1003190, 2013.
- RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. Vol. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

- RINDI, L.; LARI, N.; GARZELLI, C. Search for genes potentially involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence by mRNA differential display. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol. 258, p. 94–101, 1999.
- RODRÍGUEZ-ESPINOSA, O.; ROJAS-ESPINOSA, O.; MORENO-ALTAMIRANO, M. M.; LÓPEZ-VILLEGAS, E. O.; SÁNCHEZ-GARCÍA, F. J. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. **Immunology.** Vol. 145, n. 2, p. 213–24, 2015.
- RÖHM, M.; GRIMM, M. J.; D'AURIA, A. C.; ALMYROUDIS, N. G.; SEGAL, B. H.; URBAN, C. F. NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. **Infect Immun.** Vol. 82, n. 5, p. 1766–77, 2014.
- ROMERO, M. M.; BASILE, J. I.; LÓPEZ, B.; et al. Outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis* MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p38 MAPK and Syk. **BMC Infectious Diseases.** Vol. 14, p. 262, 2014.
- RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA E.; DI MASCIO P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação De Proteínas Por Oxigênio Singlete: Mecanismos De Dano, Estratégias Para Detecção E Implicações Biológicas. **Quim. Nova.** Vol. 29, p. 563, 2006.
- SAMUNI, A. M.; BARENHOLZ, Y. Site–activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radical Biology & Medicine.** Vol. 34, n. 2, p. 177–185, 2003.
- SARDINA, J. L. et al. p22^{phox}-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation. **Cell Death and Differentiation.** Vol. 17, p.1842–1854, 2010.
- SCHLESINGER, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not at-tenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J. Immunol.** Vol. 150, p. 2920–2930, 1993.
- SCHROECKSNADEL, K.; FISHER, B.; SCHENNACH, H.; WEISS, G.; FUCHS, D. Antioxidants suppress Th1-Type Immune response *in vitro*. **Drug Metabolism Letter.** Vol. 1, p. 166–171, 2007.
- SEGAL, A. W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. **Int J Biochem Cell Biol.** Vol. 40, n. 4–3, p. 604–618, 2008.
- SETSUKINAI, K. I.; URANO, Y.; KAKINUMA, K.; MAJIMA, H. J.; NAGANO, T. Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. **The Journal of Biological Chemistry.** Vol. 278, p. 3170, 2003.
- SHALEKOFF, S.; TIEMESSEN, C. T.; GRAY, C. M.; MARTIN, D. J. Depressed Phagocytosis and Oxidative Burst in Polymorphonuclear Leukocytes from Individuals with Pulmonary Tuberculosis with or without Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** Vol. 5, n. 1, p. 41–44, 1998.
- SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology.** Vol. 48, n. 6, p. 835–50, 1996.

- SHITE, J. et al. Antioxidant Vitamins Attenuate Oxidative Stress and Cardiac Dysfunction in Tachycardia-Induced Cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**. Vol. 38, n. 6, 2001.
- SIEDLE, B. et al. The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochemical Pharmacology**. Vol. 7559, p. 1-7, 2003.
- SINGH, R. et al. PA-824 Kills Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by Intracellular NO Release. **Science**. Vol. 322, p. 1392-1395, 2008.
- SOULE, B. P.; et al. The Chemistry and Biology of Nitroxide Compounds. **Free Radic Biol Med**. Vol. 42, n. 11, p. 1632–1650, 2007.
- SOUZA, MVN; VASCONCELOS, TRA. Drugs against tuberculose: past, present and future. **Quím. Nova**. Vol. 28, 2005.
- STEENKEN, W.; GARDNER, L. U. History of H37 strain of tubercle bacillus. **Am. Rev. Tuber**. 1946.
- STEPHAN, S.; FABRI, M. The NET, the trap and the pathogen: neutrophil extracellular traps in cutaneous immunity. **Experimental Dermatology**. Vol. 24, p. 161–166, 2015.
- STOIBER, W.; OBERMAYER, A.; STEINBACHER, P.; KRAUTGARTNER, W. D. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. **Biomolecules**. Vol. 5, n. 2, p. 702-23, 2015.
- STOKES, R. W.; HAIDL, I. D.; JEFFERIES, W. A.; SPEERT, D. P. Mycobacteria-macrophage interactions. Macrophage phenotype determines the nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages. **J Immunol**. Vol. 151, n. 12, p. 7067-76, 1993.
- STORZ, P. Reactive Oxygen Species–Mediated Mitochondria-to-Nucleus Signaling: A Key to Aging and Radical-Caused Diseases. **Science**. (332), re3. [DOI: 10.1126/stke.3322006re3], 2006.
- SUZUKI, S. et al. Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. **Oncogene**. Vol. 18, p. 6380 – 6387, 1999.
- SUY, S.; MITCHELL, J. B.; EHLEITER, D.; HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A.; KASID, U. Nitroxides Tempol and Tempo Induce Divergent Signal Transduction Pathways in MDA-MB 231 Breast Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 10, p. 17871-17878, 1998.
- TIWARI, B. K.; PANDEY, K. B.; ABIDI, A. B.; RIZVI, S. I. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. **Journal of Biomarkers**. Article ID 378790, 8pages, 2013.

TSUHAKO, M. H. et al. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood–brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation. **Free Radic. Biol. Med.** 2010. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.013.

URBAN, C. F.; REICHARD, U.; BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cellular Microbiology**. Vol. 8, n. 4, p. 668–676, 2006.

VELASCO-VELÁZQUEZ, M. A.; BARRERA, D.; GONZÁLEZ-ARENAS, A.; ROSALES, C.; AGRAMONTE-HEVIA, J. Macrophage--*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. **Microb Pathog.** Vol. 35, n. 3, p. 125-31, 2003.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil extracellular traps (NETs) — formation and Implications. **Acta Biochimica Polonica**. Vol. 60, n. 3, p. 277–284, 2013.

ZHENG, H.; LU, L.; WANG, B.; et al. Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37 Ra versus H37Rv. **PLoS ONE**. Vol. 3, n. 6, p. e2375, 2008.

ZHOU, F. et al. The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. **Leukemia Research**. Vol. 31, p. 387–393, 2007.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tuberculosis, Fact Sheet No. 104**; 2010.
WHO. Tuberculosis, Tuberculosis Global Facts; 2010/2011.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2012**. 2012.
Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/globalreport/en/>. Acesso em: 20 Set. 2013.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report for research on infectious diseases of poverty**. Geneve, Switzerland, 2012.

WIID, I.; SEAMAN, T.; HOAL, E. G.; BENADE, A. J. S.; VAN HELDEN, P. D. Total Antioxidant Levels are Low During Active TB and Rise with Anti-tuberculosis Therapy. **IUBMB Life**. Vol. 56, n. 2, p. 101-6, 2004.

WILCOX, C. S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. **Pharmacol Ther**. Vol. 126, n. 2, p. 119–145, 2010.

WONG, K-W.; JACOBS Jr, W. R. *Mycobacterium tuberculosis* exploits human interferon γ to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis. **JID**. Vol. 208, p. 109-119, 2013.

YILDIZ, C.; PALANIYAR, N.; OTULAKOWSKI, G.; KHAN, M. A.; POST, M.; KUEBLER, W. M.; TANSWELL, K.; BELCASTRO, R.; MASOOD, A.; ENGELBERTS, D.; KAVANAGH, B. P. Mechanical ventilation induces neutrophil extracellular trap formation. **Anesthesiology**. Vol. 122, n. 4, p. 864-75, 2015.

YOSHIDA, W. B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. **Cir Vasc Angiol**. Vol. 12, p. 82-95, 1996.

YOUNG, R. L.; MALCOLM, K. C.; KRET, J. E. Neutrophil Extracellular Trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the cf airway, independent of CFTR. **PLoS ONE**. Vol. 6, n. 9, p. e23637, 2011.

YOUSEFI, S.; MIHALACHE, C.; KOZLOWSKI, E.; SCHMID, I.; SIMON, H. U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extra-cellular traps. **Cell Death Differ**. Vol. 16, p.1438–44, 2009.

YUNIASTUTI, A. The role and characteristic of antioxidant for redox homeostasis control system in *Mycobacterium tuberculosis*. **International Research Journal of Microbiology**. Vol. 3, n. 13, p. 416-422, 2012.

8. APÊNDICE A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **ESTUDO EX VIVO E IN VITRO DA AÇÃO DO NITRÓXIDO TEMPOL SOBRE A RESPOSTA MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS SOBRE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

O motivo que nos leva a pedir sua colaboração é para estudar a possibilidade de identificar novas maneiras de ajudar a controlar a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, um microorganismo que causa tuberculose pulmonar e outras formas de tuberculose.

Se você se dispuser a colaborar, será coletada uma amostra de seu sangue, através de uma seringa colocada na veia de seu braço, para separarmos algumas células e estudarmos como elas respondem ao microorganismo. Este procedimento será feito uma única vez no Laboratório de Bioquímica do ICB da Unifal-MG, por um farmacêutico/bioquímico formado. Você poderá sentir algum desconforto como dor na picada da agulha e formação de hematoma no local da picada. Existe o risco de contaminação do local da picada com a agulha, mas todos os cuidados serão tomados para que isto não ocorra.

Pedimos também que você nos informe se tem ou já teve contato com portadores de tuberculose, e ainda se você usou qualquer medicamento antiinflamatório ou antibiótico nos últimos quinze dias.

Você tem direito de saber os resultados de todos os testes realizados.

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar.

Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento.

A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade.

Você poderá desistir de participar do projeto a qualquer momento, bastando avisar um dos pesquisadores cujos nomes e telefones estão no final deste documento.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos exames laboratoriais permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado em nenhuma situação. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Bioquímica, Instituto de Ciências Biomédicas, Prédio E, sala 207 C, da Unifal-MG, e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira.

Eu, _____
 fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A professora orientadora Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão e o aluno Cláudio Daniel Cerdeira, participantes desta pesquisa, garantiram que todos os meus dados serão confidenciais.

Em caso de dúvidas poderei chamar a professora orientadora, ou o aluno do curso de Ciências Farmacêuticas (Mestrado) pelos telefones: (35) 32991262 ou (35) 3299-1223 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas, localizado na Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, prédio O, sala 409-B, telefone (35) 3299-1318.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome do Voluntário

Assinatura do Voluntário

Data

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Data

Profa. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Prédio E Sala 207 C
 37130.000 Alfenas MG
 Telefone (35) 3299-1262

Cláudio Daniel Cerdeira
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Prédio E Sala 207 C
 37130.000 Alfenas MG
 Telefone (35) 3299-1262

9. ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO EX VIVO DA INFLUÊNCIA DO 4-HIDROXI-2,2',6,6'-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL (TEMPOL) SOBRE A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROS), DE ARMADILHAS EXTRACELULARES (ETS) E NA RESPOSTA MICROBICIDA TOTAL DE NEUTRÓFILOS HUMANOS CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Pesquisador: Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17064713.0.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 292.274

Data da Relatoria: 03/06/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa científica na área de saúde e com temática o estudo da ação De antioxidante nítróximo sobre neutrófilos humanos frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Projeto relevante dado ao impacto desta doença na sociedade. Pode trazer contribuições futuras para entendimento mais aprofundado da patologia.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo central deste projeto é verificar uma possível ação de antioxidante sobre a capacidade microbicida de neutrófilos Humanos submetidos a tratamento experimental *in vitro* com antioxidante sintético.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Será solicitada dos participantes a coleta de sangue venoso. A proponente apresenta os riscos como desconforto na coleta da amostra e possibilidade de ocorrência de hematomas. Os resultados poderão superar os riscos, que aparentam ser leves e transitórios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tema abordado, tuberculose, é de extrema importância para a sociedade, em virtude da mortalidade e morbidade desta doença. Projeto bem elaborado e com metodologia pertinente.

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
 Bairro: centro CEP: 37.130-000
 UF: MG Município: ALFENAS
 Telefone: (35)3299-1318 Fax: (35)3299-1318 E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS**

Continuação do Parecer: 292.274

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proponente apresentou todos os documentos necessários à avaliação (projeto, TCLE, folha de rosto). O TCLE apresenta todos os itens necessários à sua aprovação (título do projeto, objetivos, riscos, sigilo, procedimento, endereços e telefones, confidencialidade). Folha de rosto preenchida e assinada.

Recomendações:

Recomendo a aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 04 de Junho de 2014

Assinado por:

Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Bairro: centro
UF: MG
Telefone: (35)3299-1318

Município: ALFENAS
Fax: (35)3299-1318

CEP: 37.130-000
E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br