



UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

BRUNA GRONER PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS
TCD8⁺ REGULADORAS E DE MEMÓRIA APÓS INFECÇÃO POR *Mycobacterium
tuberculosis***

VITÓRIA
2020

BRUNA GRONER PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO E ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS
TCD8⁺ REGULADORAS E DE MEMÓRIA APÓS INFECCÃO POR *Mycobacterium
tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
Coorientadores: Dr. Lorenzo Lyrio Stringari
Dr^a.Silvia de Paiva e Almeida

VITÓRIA
2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

P436a Pereira, Bruna Groner, 1995-
Avaliação do perfil fenotípico e ativação in vitro de células TCD8+ reguladoras e de memória após infecção por Mycobacterium tuberculosis / Bruna Groner Pereira. - 2020.
68 f. : il.

Orientador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues.

Coorientador: Lorenzo Lyrio Stringari.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Linfócitos TCD8+ reguladores. 3. Linfócitos TCD8+ de memória. 4. Tuberculose pulmonar. I. Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Stringari, Lorenzo Lyrio. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

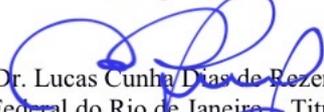
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO

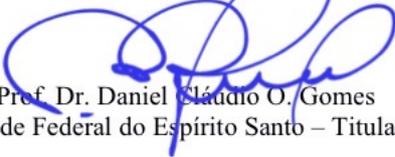
O(a) mestrando(a) Bruna Groner Pereira apresentou a tese intitulada “Efeito imunomodulatório de células TCD8+ e de memória na atividade microbicida in vitro de células mononucleares infectadas por Mycobacterium tuberculosis” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu () aprovar () reprovar a dissertação habilitando Bruna Groner Pereira a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infecciosas.

Vitória, 15 de abril de 2020.


Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador


Prof. Dr. Lucas Cunha Dias de Rezende
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Titular Externo


Prof. Dr. Daniel Cláudio O. Gomes
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Bruna Groner Pereira
Discentes



DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todo aquele
que crê em uma educação
redentora e transformadora.*

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao meu orientador Rodrigo Ribeiro Rodrigues pela oportunidade e acolhida. Ao meu coorientador Lorenzo Stringari e sua esposa Johara Stringari pelas incansáveis correções e comentários acerca do trabalho. Dedico à minha querida amiga e mentora, Silvia de Paiva e Almeida, grandes saudades!

À minha mãe, Renilda, por me ensinar o caminho do correto e que apesar de todas as nossas limitações pôde me auxiliar até os dias de hoje. Obrigada por respeitar e apoiar as minhas escolhas. À minha segunda mãe, Maria do Carmo, pelo apoio in-con-di-ci-o-nal. Aos primos Carlos Eduardo, Wildson e Fernanda pelo apoio. Ao meu querido e amado amigo, Francisco Simonassi. Não há palavras de agradecimento ou dinheiro no mundo que pague o que fez por mim durante estes anos.

A equipe de professores e tutores da Complementação Pedagógica do Ifes Campus Piúma pelo aprimoramento da minha carreira no ensino, sobre o que avaliar, quando e por que avaliar. Sobre o sentido do erro, e por me ensinarem o valor da educação. Aos professores do Ifes Campus Vitória, Isabel, Marcelo, Fernanda, Enes e João pela acolhida durante meu estágio.

Ao Instituto Humboldt por ser minha segunda casa. Aos meus queridos alunos por todo aprendizado ao longo destes dois anos. Já dizia Paulo Freire “Quem ensina aprende ao ensinar. E quem aprende ensina ao aprender”. Aos amigos do Laboratório de Imunologia Luciana, Daniel, Carlinha, Carlos, Renam e Vivian pelas considerações, seminários e pela ótima convivência. Aos bons amigos que fiz durante esta jornada em especial Luciana Stanzani e Givago, pelas noites produzindo nossos trabalhos, pelo apoio, carinho e preocupação, adoro vocês! Ao querido Clessimarque Espavier, pela paciência, pelo carinho e o apoio incondicional. Amo você.

A todo aquele que de alguma forma fez parte desta história, o meu imenso obrigada.

“Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.
Isaac Newton

RESUMO

A tuberculose (TB), causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), é considerada a nona maior causa de morte no mundo. Transmitida via aerossóis, após inalação, os bacilos alojam-se nos cumes dos pulmões sendo prontamente reconhecidos por macrófagos alveolares e células dendríticas. Em inúmeros casos o *Mtb* é capaz de evadir o sistema imune inato, sendo iniciada a resposta adaptativa com geração de células efetoras CD4⁺ e CD8⁺ responsáveis pela formação do granuloma. Durante a TB, tem sido reportada a presença de células reguladoras (Tregs) dotadas de capacidade imunossupressora, capazes de alterar a dinâmica imunológica. Ademais, a geração de células de memória durante a TB tem sido investigada, uma vez que indivíduos já tratados são suscetíveis a uma nova infecção. Nesse sentido, é crescente o número de estudos que visam compreender o papel de células reguladoras no controle da infecção pelo *Mtb* e suas implicações. Para tanto, este estudo propôs avaliar a resposta *in vitro* de células CD8⁺ à cepa virulenta H37Rv em portadores da tuberculose pulmonar ativa, indivíduos sensibilizados (TST+) ou não (TST-) ao teste tuberculínico.

Em resposta à infecção, foi observada maior frequência de TCD8⁺ ativadas em indivíduos não sensibilizados, bem como menor proliferação de TCD8⁺ em portadores da doença. Observamos aumento de TCD8⁺ reguladoras em indivíduos sensibilizados e portadores da doença. Reportamos maior frequência de CD8⁺ de memória efetora em indivíduos TST-. Portadores da tuberculose pulmonar apresentaram menor frequência de células TCD8⁺ de memória central e maior frequência de TCD8⁺ de memória central com fenótipo regulador. Indivíduos sensibilizados exibiram aumento na frequência de CD8⁺ naïve e subpopulações FOXP3⁺. Os resultados aqui apresentados apontam a presença das células TCD8⁺ Treg em indivíduos sensibilizados e doentes que contribuem com a redução da capacidade proliferativa das células TCD8⁺ efetoras e consequente déficit na geração de células de memória.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, TCD8⁺ reguladoras, células de memória.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), is considered the ninth leading cause of death in the world. Transmitted via aerosols, after inhalation, the bacilli lodge in the summits of the lungs and are readily recognized by alveolar macrophages and dendritic cells. In numerous cases, *Mtb* is able to evade the innate immune system, and the adaptive response is initiated with the generation of CD4⁺ and CD8⁺ effector cells responsible for the formation of granuloma. During TB, the presence of regulatory cells (Tregs) with immunosuppressive capacity, capable of altering the immunological dynamics, has been reported. In addition, the generation of memory cells during TB has been investigated, since already treated individuals are susceptible to a new infection. In this sense, the number of studies that aim to understand the role of regulatory cells in the control of *Mtb* infection and its implications is growing. For this purpose, this study proposed to evaluate the in vitro response of CD8⁺ cells to the virulent H37Rv strain in patients with active pulmonary tuberculosis, individuals sensitized (TST+) or not (TST-) to the tuberculin test.

In response to infection, a higher frequency of activated TCD8⁺ was observed in non-sensitized individuals, as well as less proliferation of TCD8⁺ in patients with the disease. We observed an increase in regulatory TCD8⁺ in sensitized individuals with the disease. We reported a higher frequency of TCD8⁺ of effector memory in TST- individuals. Pulmonary tuberculosis patients had a lower frequency of central memory TCD8⁺ cells and a higher frequency of central memory TCD8⁺ cells with a regulatory phenotype. Sensitized individuals exhibited an increase in the frequency of *naïve* TCD8⁺ and FOXP3⁺ subpopulations. The results presented here point to the presence of TCD8⁺ Treg cells in sensitized and TBa individuals who contribute to the reduction of the proliferative capacity of TCD8⁺ effector cells and consequent deficit in the generation of memory cells.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, TCD8⁺ regulators, memory cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do envelope celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Adaptado de Vincent et al., (2018).....	4
Figura 2: Mecanismos de resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> associada à macrófagos. Adaptado de Simmons et al, 2018.	8
Figura 3: Expressão de Ki-67 durante o ciclo celular. Adaptado de Dzulkipli; Mashor; Jaafar, 2018.	9
Figura 4: Esquemática de citômetro de fluxo óptico. <i>BD BioSciences</i> , 2020.....	21
Figura 5: Discriminação de linfócitos e monócitos no FlowJo™	22
Figura 6: Estratégia de análise de proliferação e ativação de células CD8 ⁺	23
Figura 7: Estratégia de análise para células TCD8 ⁺ Tregs.	23
Figura 8: Estratégia de análise para seleção de subpopulações CD8 ⁺ T _{NAÏVE} (CD45RA ⁺ CD27 ⁺), T _{CM} (CD45RA ⁻ CD27 ⁺), T _{EM} (CD45RA ⁻ CD27 ⁻) e T _{EMRA} (CD45RA ⁺ CD27 ⁻).....	24
Figura 9: Frequência de células CD8 ⁺ . População total de células CD8 ⁺ do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV.	26
Figura 10: Frequência de células CD8 ⁺ que expressam TBET. População de células CD8 ⁺ do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV	27
Figura 11: Proliferação de células CD8 ⁺ via Ki-67. População de células CD8 ⁺ do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV	27
Figura 12: Frequência de CD8 ⁺ reguladoras. População total de células reguladoras CD8 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e infectadas após 72 horas (T 72) com a cepa H37RV	28

Figura 13: Frequência de CD8 ⁺ reguladoras TBET ⁻ FOXP3 ⁺ e TBET ⁺ FOXP3 ⁺ . População de células reguladoras do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e infectadas após 72 horas (T 72) com a cepa H37RV	29
Figura 14: Subpopulações de memória. Frequência de subpopulações de células CD8 ⁺ de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV	30
Figura 15: Frequência de células naïve TBET ⁻ FOXP3 ⁺ e TBET ⁺ FOXP3 ⁺ . Subpopulações de células de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV.	31
Figura 16: Frequência de T _{CM} TBET ⁻ FOXP3 ⁺ e TBET ⁺ FOXP3 ⁺ . Subpopulações de células de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV	32
Figura 17: Frequência de T _{EM} TBET ⁻ FOXP3 ⁺ e TBET ⁺ FOXP3 ⁺ . Subpopulações de células de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV.	33
Figura 18: Frequência de T _{EMRA} TBET ⁻ FOXP3 ⁺ e TBET ⁺ FOXP3 ⁺ . Subpopulações de células de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Subgrupos de células de memória.....	13
Tabela 2: Receptores e anticorpos utilizados para as análises fenotípicas	20
Tabela 3: Descrição sumária das amostras	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG - Arabinogalactano

AP-1 - Proteína-1

APC - Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês, *Antigen presenting cells*)

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

BCG - *Bacilo Calmette Guérin*

CAMP - Peptídeo Antimicrobiano Catelicidina (do inglês, *Cathelicidin Antimicrobial Peptide*)

CCI - Controle de Concentração do Inóculo

CMSP - Células Mononucleares do Sangue Periférico

CTLA-4 - Proteína 4 associada a Linfócito T Citotóxico (do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*)

CXCL - Quimiocina

DC - Célula dendrítica (do inglês, *Dendritic Cells*)

DC- SIGN - Molécula de Adesão Intracelular de Células Dendríticas (do inglês, *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*)

DO - Densidade óptica

EOMES - Eomesodermina

ESAT-6 - Sistema Secretório antigênico da Proteína de 6kDa (do inglês, *Early Secretory Antigenic Target of 6kDa*)

ESX-1 - *ESX homeobox 1*

FasL- Proteína de interação Fas (do inglês, *Fas ligand*)

FDG-PET – *Fludeoxyglucose Positron Emission Tomography*

FOXP3 - Proteína FOXP3 (do inglês, *Forkhead box p3*)

GATA- Proteína 3 de ligação ao GATA (do inglês, *GATA binding protein 3*)

G-CSF - Fator estimulador de colônias granulocíticas (do inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor*)

HCV - Hepatite C

HIV - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)

IGRA - Ensaio baseado no Interferon (do inglês, *Interferon Gamma Release Assays*)

IL- Interleucina (do inglês, *interleukin*)

IL-18 - *Interleukin 18*

INF- γ - Interferon gama

IPEX - Poliendocrinopatia ligada ao X

ITGAM - Proteína de adesão Integrina (do inglês, Integrina *Integrin Alpha M*)

iTreg - Célula T reguladora induzida

LAG3 - Gene de ativação linfocítica (do inglês, *Lymphocyte-activation gene 3*)

LASER- Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)

LCV - Vírus da coriomeningite linfocítica

LN - Linfonodo

LTBI - Forma latente da infecção por *Mtb*

MDR - Cepa multidroga resistente

MHC- Complexo de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)

MOI - Multiplicidade da infecção (do inglês, *Multiplicity of infection*)

Mtb- Mycobacterium tuberculosis

Naïve - Células virgens

NDI - Núcleo de Doenças Infeciosas

NO - Óxido nítrico

NOD - Proteína do domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain protein*)

nTreg - Treg natural

OLS - Órgão linfoide secundário

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMPS - Padrão Molecular Associado ao Patógeno (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*)

PD-1 - Via de morte programada (do inglês, *Programmed Cell Death 1*)

PG - Peptideoglicano

PPD - Derivado purificado proteico (do inglês, *Purified Protein Derivative*)

PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*)

pTreg - Célula T reguladora periférica

QFT-GIT- Teste empregado no diagnóstico da LTBI (*QuantiFERON- TB Gold Intube*)

ROS - Espécie Reativa de Oxigênio (do inglês, *Oxygen reactive Species*)

TB - Tuberculose

TBa - Tuberculose Pulmonar Ativa

TBET - Fator de transcrição do grupo T-box (do inglês, *T-box transcription factor*)

TC - Tomografia computadorizada

T_{CM} - Células T de memória central (do inglês, *Central Memory T Cells*)

TCR - Receptor de célula T (do inglês, *T cell receptor*)

T_{EM} - Célula de memória efetora (do inglês, *Effector Memory T Cells*)

T_{EMRA} - Célula de memória terminalmente diferenciada (do inglês, *Terminally differentiated memory cells T Cells*)

TGF-β - Fator de Crescimento Beta (do inglês, *Transforming growth factor beta*)

Th3 - Treg tipo 3

TIGIT - Imunoreceptor com domínio Ig e ITIM (do inglês, *Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains*)

TLR - Receptor do tipo Toll Like (do inglês, *Toll like receptor*)

T_M - Célula de memória (do inglês, *T memory cell*)

T_{naïve} - Célula jovem (do inglês, *naïve T cell*)

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumour Necrosis Factor alpha*)

Tr1 - Treg tipo 1

Treg - Célula reguladora (do inglês, *regulatory T cell*)

T_{RM} - Célula T de memória residente (do inglês, *resident memory T cell*)

T_{SCM} - Células tronco de memória (do inglês, *memory stem cell*)

T-SPOT - Teste empregado no diagnóstico da LTBI

TST - Reação de Mantoux (do inglês, *Mantoux Tuberculin Skin Test*)

WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	3
1.3 INFECÇÃO LATENTE PELO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (LTBI).....	5
1.4 TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA (TBa).....	6
2 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO	7
2.1 IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA	8
3 JUSTIFICATIVA	15
4 HIPÓTESE	15
5 OBJETIVOS	16
5.1 OBJETIVO GERAL.....	16
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
6 MATERIAIS E MÉTODOS	16
6.1 MODELO DO ESTUDO.....	16
6.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	17
6.2.1 Critérios de inclusão	17
6.2.2 Critérios de exclusão	17
6.3 COLETA DE SANGUE E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	17
6.4 ISOLADOS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
6.4.1 Seleção e preparação dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
6.4.2 Verificação da concentração bacteriana após descongelamento	18
6.5 ISOLAMENTO E INFECÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP).....	18
6.6 MICROCULTURAS DE CMSP	19
6.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO E DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS CMSP	20
6.7.1 Avaliação do perfil de ativação de células	20
6.7.2 Estratégia de análise	20
6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	24
6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
7 RESULTADOS	25
7.1 CÉLULAS CD8 ⁺	26
7.1.1 CD8⁺ TBET⁺	26
7.1.2 Proliferação de células CD8⁺	27
7.2 CÉLULAS CD8 ⁺ REGULADORAS	28
7.3 CÉLULAS CD8 ⁺ DE MEMÓRIA	29
7.3.1 Frequência de células T_{naïve} do tipo FOXP3⁺ com e sem expressão de TBET	30
7.3.2 Frequência de células T_{CM} do tipo FOXP3⁺ com e sem expressão de TBET	31
7.3.3 Frequência de células T_{EM} do tipo FOXP3⁺ com e sem expressão de TBET	32
7.3.4 Frequência de células T_{EMRA} do tipo FOXP3⁺ com e sem expressão de TBET	33
8 DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) esteve sempre presente nos registros e relatos de episódios de doença da espécie humana, evidenciado por estudos de paleomicrobiologia. Sua presença foi observada em registros arqueológicos que datam do Egito antigo, da América pré-colombiana e da Europa do período neolítico (Donoghue, 2016). Seu agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), foi descrito com capacidade de infectar diferentes hospedeiros (BAÑULS et al., 2015).

O aumento no número de coinfeções entre o HIV e TB, bem com a emergência de cepas multidroga resistente (MDR) tem dificultado a prevenção e o controle da doença (Ai et al., 2016). Transmitida através de aerossóis, o *Mtb* é reconhecido por macrófagos alveolares (Ryan P. Larson; Shahin Shafiani; Kevin B. Urdahl, 2013). Dotado de mecanismos de evasão, a micobactéria é capaz de sobreviver à primeira linha de defesa do sistema imunológico, promovendo a sobrevivência intracelular do bacilo (Ai et al., 2016). A falha na erradicação da bactéria promove o recrutamento de células ao sítio da infecção com consequente desenvolvimento de inflamação crônica e do granuloma (BRIGHENTI; ANDERSSON, 2012).

O desenvolvimento da imunidade adaptativa promove a expansão de células dotadas de capacidade imunossupressora, envolvidas na autoimunidade e autotolerância (Tregs) (Bocian et al., 2017). Em infecções crônicas, como a TB, além de prevenir o dano tecidual decorrente da inflamação, as Tregs têm demonstrado habilidade de suprimir a resposta celular a antígenos do *Mtb*, estabilizando um nicho para infecção crônica, uma vez que auxilia na persistência do patógeno e na erradicação microbiana (RYAN P. LARSON; SHAHIN SHAFIANI; KEVIN B. URDAHL, 2013).

Linfócitos de memória (T_M), por outro lado, compreendem um grupo heterogêneo de células de vida longa (Appay et al., 2008; Tonaco et al., 2017), sendo a expansão clonal e proliferação de células T antígeno-específicas essencial na geração de memória imunológica (Ratajczak et al., 2018). T_M podem ser fenotipicamente subdivididas por meio de marcadores de superfície coestimulatórios (CD27 e CD28) e ativação (CD45Ra e CD45Ro) (Appay et al., 2008; Tonaco et al., 2017). Subpopulações de memória têm sido analisadas sobretudo em estudos que buscam novas alternativas de imunização, e têm sido alvo de estudos comparativos no que diz respeito a resposta imunológica anti-*Mtb* entre indivíduos infectados, os quais

desenvolvem a forma pulmonar ativa, que foram tratados e curados, e dentre aqueles que apresentam estado de latência (TONACO et al., 2017).

Nesse interim, a compreensão da imunidade local e sua correlação com a proteção do parênquima dos pulmões é essencial no desenvolvimento de estratégias vacinais (Perdomo et al., 2016). Logo, este estudo propõe avaliar *in vitro* o papel de células CD8⁺ reguladoras e subpopulações de memória em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) – infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* – de indivíduos portadores da tuberculose pulmonar ativa (TBa), saudáveis, reatores (TST+) ou não ao teste tuberculínico (TST-).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Apesar de campanhas ativas por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS, do inglês, WHO: *World Health Organization*) e da atividade de políticas de saúde pública governamental, a TB permanece como a nona causa de morte do mundo. No ano de 2016 foram estimados cerca de 10,4 milhões de novos casos de TB, 1,3 milhão de mortes devido à infecção por *Mtb*, e 374 mil óbitos registados em indivíduos coinfectados com HIV (WHO, 2018). O Brasil permanece como um dos países referenciados na lista dos 20 países no mundo com maior prevalência de casos de TB (WHO, 2018). De acordo com dados oficiais do governo brasileiro, apesar da redução da incidência e de mortalidade por TB, foram registrados 69.569 casos novos em 2017 e 4.426 óbitos por tuberculose em 2016 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018). Estima-se que um quarto da população global, cerca de 1.7 bilhão de indivíduos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018), seja portadora da forma latente da infecção (LTBI), caracterizada por um quadro clínico assintomático e de caráter não infeccioso, porém com risco de progressão para TBa (HOUBEN; DODD, 2016; STEK et al., 2018).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O bacilo causador da TB pertence ao gênero *Mycobacterium* que abrange agentes patogênicos de relevância para a espécie humana como *Mycobacterium leprae*, causador da hanseníase, *Mycobacterium africanum*, capaz de infligir sintomas semelhantes a TB, ainda que com menor grau de patogenicidade, e o *Mycobacterium bovis*, causador da TB bovina, (Gengenbacher; Kaufmann, 2012). Composto de açúcares e lipídeos, o envelope celular lipídico corresponde a cerca de 40% de seu peso seco (Brennan, 1995). O *Mtb* é classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), aeróbio estrito e parasita intracelular facultativo, que cresce a temperatura de 37 °C, com disponibilidade de oxigênio e nutrientes, produzindo colônias de aspecto seco e de cor amarelo-claro quando cultivadas em ágar (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012; JACKSON, 2014; NUNES et al., 2008).

O envelope celular do *Mtb* (Figura 1) é composto por duas membranas, uma interna, típica de membranas bacterianas, e uma espessa parede celular, denominada “core” constituída por peptidoglicanos (PG) ligados covalentemente a heteropolissacarídeos, como o arabinogalactano (AG), e a formas esterificadas de ácidos micólicos, os quais conferem ao *Mtb* características de resistência a agentes terapêuticos, e a capacidade de criar biofilmes (BRENNAN, 1995; JACKSON, 2014).

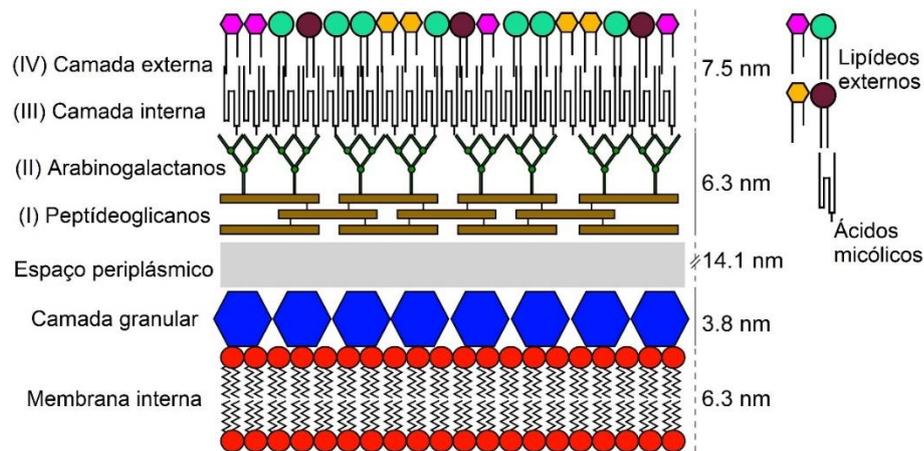


Figura 1: Representação esquemática do envelope celular do *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptado de Vincent et al., (2018).

O *Mtb* é propagado via aerossóis, através da tosse, espirro ou fala (Bañuls et al., 2015). Os doentes que apresentam baciloscopia de escarro positiva (designados de doentes bacilíferos) constituem a maior fonte de contaminação e dispersão da doença, de forma proporcional à frequência e intensidade dos episódios de tosse, espirros e à presença de doença cavitária (Churchyard et al., 2017). Após a inalação, o bacilo atravessa mucinas e células epiteliais ciliadas, até estabelecer-se nos pulmões. No sítio da infecção, macrófagos alveolares exibem resposta do tipo pro-inflamatória, responsável pela eliminação do *Mtb* (SIMMONS et al., 2018).

O sucesso da infecção e o desenvolvimento da forma pulmonar da TB depende de variados fatores, que culminam em quatro diferentes desfechos clínicos: a cura espontânea, doença primária, caracterizado pelo estabelecimento da doença ativa (TBa); a infecção latente do *Mtb* (LTBI); e a doença causada pela reativação endógena do bacilo após anos de latência (BAÑULS et al., 2015; GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

Apesar de inúmeras limitações, o diagnóstico microbiológico da TBa através da microscopia de escarro tem sido amplamente empregado em países de baixa e média renda. Dotado de acurácia superior, o *Xpert MTB/RIF*, um ensaio molecular baseado na tecnologia de *GeneExpert*, tem sido recomendado pela OMS como diagnóstico de primeira linha em crianças ou adultos suspeitos de TBa, assim como em indivíduos HIV positivos (Pai et al., 2016). O tratamento padrão para TB baseia-se no uso de quatro antibióticos, sendo o *Mtb* definido como multirresistente (MDR-TB) quando apresenta resistência à isoniazida e a rifampicina (Pai et al., 2016). O desenvolvimento de novas terapias tem-se evidenciado lento e dificultoso, o que reforça a prioridade da simplificação do regime de tratamento, visando o controle global da doença (SAMET, 2004).

Empregada como medida profilática contra a TB, a BCG (*Bacilo Calmette Guérin*) foi empregada pela primeira vez em 1921 e introduzida no Brasil em 1976, administrada via intradérmica em dose única após o nascimento (Ferreira et al., 2015). Desenvolvida pelos bacteriologistas Albert Calmette e Camille Guérin a partir de uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, a BCG é capaz de prevenir a tuberculose miliar e meníngea, formas extrapulmonares da tuberculose que acometem crianças, porém incapaz de conferir proteção contra a forma mais comum da doença, a tuberculose pulmonar (PERDOMO et al., 2016).

1.3 INFECÇÃO LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI)

Durante a LTBI o *Mtb* é capaz de sobreviver sob estado de dormência, caracterizado por baixos níveis de replicação e redução do metabolismo (Gengenbacher; Kaufmann, 2012). Com o objetivo de aprimorar conhecimentos acerca de vias sinalizadoras para reativação do bacilo, estudos do transcriptoma e proteoma têm contribuído na identificação de mecanismos chave no estabelecimento da dormência e persistência do patógeno. Pressupõe-se que durante a reativação da forma latente, o bacilo seja capaz de reassumir metabolismo e condições normais de crescimento (LIPWORTH et al., 2016; VEATCH; KAUSHAL, 2018).

Usada no diagnóstico de LTBI, a Prova Tuberculínica, ou *Mantoux Tuberculin Skin Test* (TST), baseia-se na inoculação intradérmica de derivados proteicos do *Mtb* (PPD, do inglês, *Purified Protein Derivative*) e na reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV). A mensuração

da enduração é realizada entre 48 e 72 horas após a inoculação do PPD (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O teste apresenta algumas limitações, dentre estas a geração de resultados falso-positivos referentes a uma exposição prévia a micobactérias não tuberculosas, a aplicação incorreta, interpretação errôneas do edema e a reação cruzada em indivíduos previamente imunizados com a BCG (AUGUSTE et al., 2017; SIMMONS et al., 2018)

Atualmente tem sido recomendado o ensaio baseado na liberação de interferon gama (IFN- γ), o IGRA, do inglês, *Interferon Gamma Release Assays*, sendo disponíveis comercialmente o *QuantiFERON-TB Gold In Tube* (QFT-GIT; *Qiagen* 0594-0201) e o *T-SPOT* (*Oxford Immunotec International*) TB. Na ausência de um padrão ouro para o diagnóstico de LTBI, alguns estudos têm buscado a existência de associação entre os resultados obtidos pelo IGRA e o TST. Estes dados poderiam auxiliar no entendimento da progressão da LTBI para TBa ativa em crianças, em indivíduos imunocomprometidos, e na dinâmica da transmissão entre pessoas que convivem em áreas de alta incidência (≥ 40 casos a cada 100 mil habitantes) (AUGUSTE et al., 2017).

1.4 TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA (TBa)

A reativação do bacilo durante a LTBI reflete na progressão para a TBa, caracterizada pela dispersão de bacilos em secreções respiratórias, especialmente durante episódios de tosse (Ernst, 2012). A TB pode-se apresentar de duas formas. Uma é a denominada tuberculose primária, caracterizada pelo desenvolvimento da doença após a inalação de partículas infectadas, causando pneumonia tuberculosa ou linfadenopatia, decorrentes do aumento da carga bacilar nos alvéolos e no interstício. Já a infecção pós-primária ou reativação endógena da LTBI, acomete os ápices dos pulmões, com presença de nódulos nos lobos superiores ou nos cumes dos lobos inferiores, podendo ou não apresentar cavitação (Stek et al., 2018). Ao passo que a TB primária medeia o grau de resposta, na infecção pós primária o *Mtb* é capaz de evadir a imunidade sistêmica e multiplicar-se (HUNTER, 2018).

Radiografias do tórax são largamente empregadas na visualização de dano pulmonar, porém técnicas de tomografia computadorizada (TC) quando associadas a tecnologia de FDG-PET (do inglês, *Fludeoxyglucose*[^{18}F]-*Positron Emission Tomography*), apresentam maior

sensibilidade no monitoramento da evolução das lesões durante o tratamento. Essa maior sensibilidade deve-se à combinação de imagens anatômicas e rastreamento de atividade metabólica, possibilitando a visualização de lesões metabolicamente ativas, as quais podem eventualmente estar presentes antes das manifestações clínicas da doença, e que podem persistir após o fim do tratamento (STEK et al., 2018).

2 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

A TB é transmitida via inalação de núcleos (de 1-5 μm de diâmetro) suspensos, gerados por gotículas respiratórias capazes de alojar partículas do *Mtb* (Nardell, 2016). Willian F. Wells foi o pioneiro ao estabelecer o risco de infecção na TB empregando exposição de porcos-da-índia a bacilos de tuberculose (Riley, 1957).

Sabe-se que, embora apresentem baixa menor taxa de infecção, indivíduos com baciloscopia negativa e cultura positiva têm correspondido de 17 a 20% dos casos e taxa de 6,2/100 de infecção entre os portadores de cultura negativa (Behr et al., 1999; Calligaro et al., 2017), sugerindo que indivíduos com cultura negativa não devem ser desconsiderados como fonte de infecção (CHURCHYARD et al., 2017).

Uma vez que tem entrada pelas vias aéreas, a infecção se estabelece com maior frequência nos lobos superiores. Depois de atingir os alvéolos pulmonares, os bacilos são prontamente reconhecidos por uma variedade de células fagocíticas como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e até pneumócitos do tipo II (Ganbat et al., 2016). O reconhecimento do *Mtb* pelas células que compõem o sistema imunitário inato é mediado pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*), os quais podem estar presentes na superfície celular ou localizados intracelularmente, solúveis ou em associação com membranas internas (ERNST, 2012).

As estratégias utilizadas pelo *Mtb* no escape e resistência após reconhecimento pelos

macrófagos incluem a adaptação e o dano fagossomal (Figura 2) (Queval et al., 2017). A secreção da proteína de ESAT-6 (do inglês, *Early Secretory Antigenic Target of 6kDa*) – considerado um fator de virulência secretado pelo *Mtb* por um sistema especializado – o ESX-1 (sistema de secreção ESAT-6) – é capaz de interagir diretamente com receptores do tipo TLR2 (do inglês, *Toll Like Receptors*) reduzindo a secreção de interleucina (IL)-12 nos macrófagos auxiliando a persistência e sobrevivência do bacilo (Pathak et al., 2007; Squeglia et al., 2018), além de regular o pH do vacúolo em torno de 6,3 - 6,5 (QUEVAL et al., 2017).

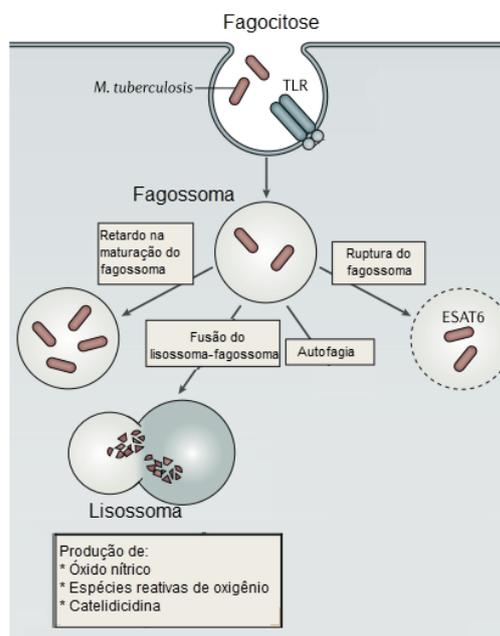


Figura 2: Mecanismos de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* associada à macrófagos. Adaptado de Simmons et al, 2018.

2.1 IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA

Células dendríticas (Dcs) (do inglês, *Dendritic Cells*), são conhecidas como células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês, *Antigen Presenting Cells*). Possuem a capacidade de fagocitar e processar células infectadas, patógenos e células apoptóticas em peptídeos e apresentá-los via complexo de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe I ou II a células *naïve* ou em repouso (Ariel; Sebastian, 2007). O contato entre o MHC e o TCR (do inglês, *T Cell Receptor*) na presença de (IL) - 2 promove a ativação e proliferação celular. Sabe-se que células CD4 dependem mais tempo

para serem sensíveis a menores concentrações da citocina do que células CD8, que exibem alta sensibilidade em respostas proliferativas (Bunney et al., 2017).

Durante a fase de divisão e proliferação celular, a proteína Ki-67 passa a ser expressa em todas as fases (Figura 3) (Gerdes et al., 1984; Soares et al., 2010). Uma vez iniciada a divisão, durante a interfase é expressa no núcleo, se acumulando no nucléolo na fase G2. No início da mitose é translocada para a periferia dos cromossomos mitóticos onde permanecem até a formação do núcleo na fase G1 após a segregação cromossômica, sendo portanto considerada pela comunidade científica como marcador de proliferação celular (SALES GIL; VAGNARELLI, 2018).

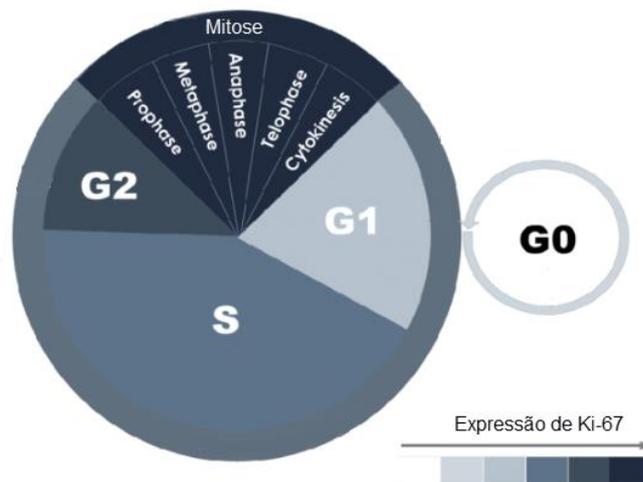


Figura 3: Expressão de Ki-67 durante o ciclo celular. Adaptado de Dzulkipli; Mashor; Jaafar, 2018.

A imunidade celular contra o *Mtb* tem sido demonstrada dependente de células CD4⁺ produtoras de interferon γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Brighenti; Andersson, 2012). O direcionamento para o fenótipo CD4⁺ do tipo Th1 é caracterizado pela expressão do fator de transcrição TBET, codificado pelo Tbx21 (Yong Woo Jung et al., 2014), (do inglês, *T-box transcription factor*), secreção de citocinas inflamatórias, TNF- α , IFN- γ e interleucinas (IL) 2 e 12 fundamentais para a ativação dos macrófagos, neutrófilos e na estimulação da produção de anticorpos pelos linfócitos B, promovendo a contenção da infecção e limitando a evolução para a doença ativa (LU et al., 2011; SALGAME, 2005).

Por outro lado, se expressarem GATA-3 (do inglês, *GATA binding protein 3*) ao invés de TBET, exibem um fenótipo do tipo Th2 e passam a secretar IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-

25, promovendo a inibição da ativação dos macrófagos e diminuição na proliferação de linfócitos T produtores de IFN- γ (Harris et al., 2007; Mendez-Samperio, 2014). O resultado traduz-se em progressão da doença e aumento da carga bacilar (HARRIS et al., 2007).

O subtipo Th17 caracteriza-se como um subgrupo distinto de Th1 e Th2 relacionado com a expressão de citocinas como IL-17 (também descrita como IL-17A) IL-21, IL-22 e IL-17F. Dentre estas citocinas, a IL-17 induz a expressão de fatores pró-inflamatórios, como fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF), IL-6 e quimiocinas, que na patologia da TB contribuem para o recrutamento de neutrófilos que promovem a formação do granuloma e aumento da expressão de quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11, as quais recrutam células que produzem IFN- γ para o sítio da lesão, contribuindo na formação da injúria (LUO et al., 2017).

Células CD8⁺ *naïve* circulam de forma contínua através do sangue e órgãos linfóides secundários (OLS). Após o reconhecimento dos antígenos, as células CD8⁺ ativadas passam por fases distintas: 1) Expansão; 2) Contração da população ativada via FAS-FAS ligante; 3) Formação e maturação de memória; (Angelosanto; Wherry, 2010; Samji; Khanna, 2017). Já as efetoras são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e mediadores citotóxicos como perforina e granzima B, as quais exercem um importante papel em respostas antimicrobianas (Behr et al., 2018; Brighenti; Andersson, 2012). É importante ressaltar que em muitos indivíduos a resposta inata contra o *Mtb* é eficiente, não sendo iniciada a resposta adaptativa e a geração de memória imunológica, mesmo em situações de exposições repetidas ao patógeno (BRIGHENTI; ANDERSSON, 2012; MORRISON; PAI; HOPEWELL, 2008).

Células T reguladoras (Tregs), compreendem uma subpopulação de linfócitos que exercem um importante papel na manutenção da homeostase do sistema imunológico, estando envolvidas na autotolerância, autoimunidade e supressão de células do sistema imunitário (LUO et al., 2017; SAKAGUCHI, 2004). Tregs tem sido associadas a uma ampla variedade de patógenos bacterianos, virais, parasitas e principalmente envolvidas no estabelecimento de infecções crônicas, devido à capacidade de prevenir o dano tecidual decorrente da inflamação, ao passo que, dificultam a erradicação microbiana (Ryan P. Larson; Shahin Shafiani; Kevin B. Urdahl, 2013).

Originadas via diferenciação de células *naïve* por meio da estimulação do TCR (do inglês, *T cell receptor*), ou de precursores que não expressam IL-2, são caracterizadas pela expressão de CD4, CD25, FOXP3, L-selectina (CD62L), integrina alfa (CD103), LAG-3, receptor de TNF-2, receptores do tipo Toll like 4, 5, 7 e 8, e a expressão de níveis basais de IL-7 (CD127), empregado na distinção ente outros linfócitos (PEREIRA et al., 2017).

Tregs CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ constituem o fenótipo mais comumente estudado (Bocian et al., 2017), sendo caracterizadas pela alta expressão de CD25⁺ (IL-2R α), um marcador de ativação em células T descrito por Sakaguchi e colaboradores na década de 90 (Guyot-Revol et al., 2006; Sakaguchi et al., 1995). Achados de Ribeiro-Rodrigues et al., (2006) sugerem que na TBa, a depleção de células CD4⁺CD25⁺ refletem no aumento da carga bacilar e na produção de IFN- γ inferindo no papel modulatório de Tregs na resposta *Mtb*-específica.

O fator de transcrição *Forkhead box p3* (FOXP3) foi descrito por Shohei Hori como o principal gene regulador na diferenciação de Tregs tímicas e periféricas (Hori, 2003), sendo considerado um marcador intracelular exclusivo essencial para o desenvolvimento e funcionalidade destas células (Luo et al., 2017; Serrano et al., 2015). Expresso predominantemente em células CD4⁺CD25⁺, mutações no gene podem levar ao desenvolvimento de desordens proliferativas como a poliendocrinopatia imune e a enteropatia ligada ao gene X (Hori; Sakaguchi, 2004). Membro da subfamília P da família de proteínas FOX (Stroud et al., 2006), o FOXP3 integra um domínio central, o qual contém regiões de zinco C2H2, *zipper* de leucina, e um domínio repressor na porção N-terminal. A interação entre o domínio *forkhead* com a sequência alvo de ativação de proteína-1 (AP-1), bloqueia o complexo formado pela AP-1 e o fator nuclear ativado nas células T, interferindo na ativação destas (PEREIRA et al., 2017).

Gershon; Kondo, (1970) foram pioneiros na observação de células imunológicas com funções reguladoras. Sabe-se que durante as primeiras cinco semanas após a infecção, Tregs são recrutadas de forma não específica aos pulmões devido à expressão de receptores de quimiocinas e moléculas que facilitam a migração aos tecidos inflamados (Burl et al., 2007). Sabe-se que no contexto da imunossupressão, no qual Tregs são predominantes sobre o perfil Th17, o *Mtb* é capaz de disseminar-se mais facilmente e que o balanço entre estas populações leva ao desenvolvimento do granuloma, controlando a disseminação do *Mtb* (Cardona;

Cardona, 2019).

Dotadas de alta capacidade supressora, expressam constitutivamente CD25 e são sensíveis a ativação *in vitro* por IL-2. Acredita-se que assim como células CD4⁺, CD8⁺ reguladoras sejam capazes de super modular receptores em DC's (Churlaud et al., 2015; Oderup et al., 2006). Uma vez que são capazes de retardar a apresentação de antígenos micobacterianos à DC's, poderiam impactar negativamente na geração de memória imunológica. (Boer et al., 2013).

A presença de células CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ têm sido também relatada em lesões granulomatosas de linfonodos infectados pelo *Mtb* (Joosten et al., 2007). Nesse contexto, estas células regulam e promovem a persistência do bacilar, no qual o desequilíbrio entre estas populações poderia culminar na reativação ou disseminação da micobactéria.

É importante ressaltar que número de estudos acerca de células CD8⁺ reguladoras ainda é reduzido e limitado quando comparado a células CD4⁺ no âmbito de infecções micobacterianas como a tuberculose.

2.1.2 Células de memória

Células de memória são células de longa vida, antígeno específica, capazes de reconhecer o mesmo antígeno durante segundo contato e possuem um papel essencial na imunidade contra patógenos microbianos (ROSENBLUM; WAY; ABBAS, 2016; SAMJI; KHANNA, 2017).

A localização de células T em diferentes sítios é atribuída à expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocina. São classificadas em células de memória central (T_{CM}), de memória efetora (T_{EM}), de memória residente (T_{RM}) e células tronco de memória (T_{SCM}) (Kurachi, 2019; Marieke et al., 2019), e são amplamente caracterizadas com base na expressão de marcadores de superfície e fatores de transcrição (Tabela 2) (ROSENBLUM; WAY; ABBAS, 2016).

Tabela 1: Subgrupos de células de memória

Subgrupo	Fenótipo	Localização	Fatores de transcrição
T _{EM}	CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ CD27 ⁻	Circulação	TBET ^{high}
T _{CM}	CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺	Circulação Linfonodos	TBET ^{low} EOMES ^{high}
T _{EMRA}	CCR7 ⁻ CD45RA ⁺ CD27 ⁻	Circulação	

Fonte: Adaptado de Martin; Badovinac (2018).

O TBET é essencial aos linfócitos CD8⁺ no desenvolvimento e aquisição de memória. Sua expressão é induzida pelo reconhecimento do TCR a IL-12R, que resulta no desenvolvimento de células efetoras diferenciadas. A reexposição a antígenos ou o reconhecimento de citocinas inflamatórias leva à super expressão de TBET durante infecções secundárias ou terciárias, o que permite a célula manter um estágio menos diferenciado (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013).

O TBET e a eomesodermina (EOMES), outro fator do grupo *T-box*, desenvolvem um importante papel no silenciamento de células CD4 e na aquisição do sinal duplo positivo dos timócitos (Cobb et al., 2009). O TBET e o EOMES, quando ausentes em células CD8⁺, levam à diferenciação anômala, passando a produzir IL-17 (Angelosanto; Wherry, 2010). Além disso, a persistência de alta carga viral e da cronicidade de infecções podem levar a defeitos funcionais, gerando células CD8⁺ exaustas, que perdem progressivamente a capacidade de sintetizar INF- γ e IL-2, proliferar-se, e eliminar de forma eficiente o patógeno (ANGELOSANTO; WHERRY, 2010).

O CD27 e o CD28, moléculas coestimulatórias, são empregados comumente na distinção de células CD8⁺ *naïve*, assim como o CD45 na distinção de células efetoras e de memória (Tomiya; Matsuda; Takiguchi, 2002). O CD45 é uma glicoproteína constituinte da membrana dos linfócitos. A expressão de suas isoformas resultam no estado de ativação das células. Uma vez ativadas, células *naïve* CD45RA, expressam a isoforma CD45RO, resultado da conversão após a migração destas células aos tecidos periféricos. Células que re-expressam o CD45RA são altamente diferenciadas e dotadas de baixa capacidade proliferativa, que ao

migrar para os sítios da lesão, exercem sua função efetora através de secreção de citocinas como INF- γ e TNF- α , (HENSON; RIDDELL; AKBAR, 2012).

Células CD8⁺ de fenótipo CD27⁻CD45RA⁺ podem ser definidos como células terminalmente diferenciadas (EMRA) (Appay et al., 2008), CD27⁺CD45RA⁻ de memória central, e CD27⁻CD45RA⁻ como células de memória efetora (Miyara et al., 2009; Moro-García et al., 2018; Tomiyama; Matsuda; Takiguchi, 2002). Células *naïve*, por outro lado são identificadas pela expressão de moléculas como CD45RA⁺CD27⁺ (Lipp et al., 1999). A expressão diferencial destes quatro marcadores possibilita a distinção de células não envolvidas em fases de infecção aguda ou primária, referidas como “células em descanso” ou “*resting*” (APPAY et al., 2008).

T_{EM} e T_{CM} consistem em subpopulações com variada função e localização anatômica, essenciais na resposta imunitária, uma vez que alguns patógenos são transportados via vasos linfáticos e drenados nos linfonodos (Samji; Khanna, 2017). T_{CM} são situadas preferencialmente no baço e em linfonodos e expressam CD62L, CCR7 e CD27, além de possuírem alta capacidade proliferativa após uma infecção secundária. T_{EM}, por outro lado, encontradas primariamente no sangue periférico e em tecidos não linfoides, como fígado e pulmões, são dotadas de alta capacidade citolítica, mesmo na ausência de estímulo, uma das principais diferenças entre células de memória e efetoras.

Singh et al., 2019 reportaram maior frequência de CD8⁺CD45RO⁺ em indivíduos portadores da TB, após estímulo da proteína cepa Rv2626c. Ao avaliar o fenótipo de células de memória entre indivíduos imunizados via BCG e portadores da doença, os autores também verificaram menor frequência de CD8/CD45RA no segundo grupo. Marín et al., (2012) demonstram redução na frequência de células de memória em indivíduos portadores da doença em resposta a antígenos micobacterianos.

Ainda há ausência dados concretos que remetem à geração de células de memória durante a infecção pelo *Mtb*. O questionamento acerca da funcionalidade ainda permanece, uma vez que estudos mais anteriores demonstram alta taxa de reinfecção, é cerca de sete vezes a taxa da incidência bruta em indivíduos tratados (VERVER et al., 2005).

3 JUSTIFICATIVA

O papel de subgrupos CD8⁺ tem sido largamente discutido nas últimas décadas (Samji; Khanna, 2017). Diversos estudos buscam estabelecer o papel destas células em doenças inflamatórias crônicas como asma, psoríase, e a TB (Axelsson-Robertson et al., 2015; Carranza et al., 2006). Na TB, observa-se que a reinfeção de indivíduos tratados pode acarretar o desenvolvimento de nova doença. Nessa perspectiva, questiona-se o papel de CD8 Tregs e de memória na infecção pelo *Mtb* (TONACO et al., 2017).

4 HIPÓTESE

A presença de Tregs no sítio de infecção do *Mtb* pode acarretar o retardo da atividade microbicida, desta maneira permitindo a sobrevivência e replicação dos bacilos. A caracterização de células T CD8⁺ e seus subgrupos de memória, com características reguladoras, podem atuar diretamente na alteração da dinâmica imunológica promovendo a persistência do patógeno.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de células TCD8⁺ reguladoras e de memória in vitro em resposta à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de pacientes portadores de tuberculose ativa (TBa), indivíduos saudáveis, reatores (TST+) ou não ao teste tuberculínico (TST-).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência, proliferação e ativação das células CD8⁺ via Ki-67 e TBET em culturas celulares de indivíduos TST+, TST- e TBa.
- Analisar a frequência de células CD8⁺ reguladoras em culturas celulares de indivíduos TST+, TST- e TBa;
- Analisar a frequência de células CD8⁺ de memória culturas celulares de indivíduos TST+, TST- e TBa.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MODELO DO ESTUDO

O projeto proposto corresponde a um estudo descritivo, transversal, que visa avaliar a forma como os voluntários respondem à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. O estudo foi conduzido nos laboratórios de Micobacteriologia e de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), localizados no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), de março de 2018 a fevereiro de 2020. Projeto sob amparo do parecer de número 1.203.318.

6.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

6.2.1 Critérios de inclusão

- Ter idade maior que 18 anos;
- Enquadrar-se em qualquer dos grupos da pesquisa (TST-, TST+ ou TBa);
- Avaliação pelo teste tuberculínico, classificado negativo (valor de leitura inferior a 5mm (TST-) ou classificado positivo (valor de leitura superior a 5mm (TST+));
- Aceitar os termos presentes no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo CEP - ES.

6.2.2 Critérios de exclusão

- Relato o uso de medicamentos corticoides nos últimos cinco dias ou anti-inflamatórios não esteroidais nas últimas 10 semanas;
- Paciente HIV positivo ou que apresente qualquer condição que comprometa sua resposta imunológica.

6.3 COLETA DE SANGUE E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa, utilizando tubos de coleta à vácuo contendo heparina e coletados 30 mL de sangue periférico. Após de realizado a coleta, as amostras foram processadas a fim de permitir a separação dos componentes celulares por purificação em gradiente de densidade.

6.4 ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*

6.4.1 Seleção e preparação dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis*

Para os ensaios de infecção in vitro, foi empregada cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* virulenta de referência ATCC 27294 (H37Rv), gentilmente cedida pelo laboratório da Micobacteriologia. Estas cepas encontravam-se armazenadas em ultra-freezer (-80 °C) e foram repicadas em meio de cultura Ogawa-Kudoh. O protocolo padrão para este procedimento

consistiu em, após incubação a 37 °C por 21 dias, as colônias foram inoculadas em meio de cultura líquida com homogeneização das colônias. O sobrenadante (obtido após repouso por 30 minutos) foi ajustado a uma diluição que corresponda a uma densidade óptica (DO) igual a 1 (medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 265nm).

Após centrifugação (4000 xg, 30 minutos), o centrifugado de micobactérias foi ressuspendido em meio de cultura 7H9 30 % (v/v) glicerol. Após homogeneização da suspensão, as micobactérias foram sonicadas (3 ciclos de 10 segundos cada, com intervalos de 5 minutos). A suspensão foi armazenada em alíquotas de 500 µL de uso único em ultra-freezer (-80 °C). Antes da utilização nos ensaios de infecção, as alíquotas foram descongeladas em estufa a 37 °C, lavadas e ressuspendidas em meio 7H09 suplementado.

6.4.2 Verificação da concentração bacteriana após descongelamento

Para verificar a concentração bacteriana foi realizado o Controle da Concentração do Inóculo (CCI). As alíquotas foram descongeladas e realizadas diluições seriadas (com fator de diluição de 10) em RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino inativado 10% (v/v), L-Glutamina 10 mM e HEPES 10 mM, iniciando-se com um inóculo de 0,1 mL da suspensão bacteriana e homogeneizada em 0,9 mL de RPMI Completo (diluição 1:10). Este procedimento foi repetido até a diluição de 1:1000. Foram realizados inóculos de 30 µL (em triplicata) em placas de Petri tripartidas contendo meio Middlebrook 7H11 (Becton Dickinson) enriquecido com Middlebrook OADC Enrichment (Becton Dickinson) e 5% Glicerol (Vetec). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 21 dias, sendo realizada contagem de colônias aos 14° e 21° dias. A contagens obtidas foram utilizadas para determinar a concentração da suspensão bacteriana estoque e o inóculo em cada ensaio experimental.

6.5 ISOLAMENTO E INFECÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)

Inicialmente, as amostras de sangue coletadas foram fracionadas em volumes iguais de 15 mL em tubos de fundo cônico de polipropileno de 50 mL diluídas em 15 mL de PBS (uma diluição 1:2) e homogeneizadas por inversão. As amostras diluídas foram transferidas para dois tubos contendo 15 mL Ficoll-Histopaque 1077 (SIGMA-Aldrich) e submetidas à centrifugação

(400 xg/30'/20 °C), sem freio. Ao final da centrifugação, observa-se a camada superior formada pelo plasma e seus constituintes, seguida da camada de CMSP, Ficoll, granulócitos e por fim eritrócitos.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, as CMSP localizadas sobre a camada de Ficoll foram coletadas. Durante a coleta, as CMSP foram transferidas para um novo tubo de fundo cônico de polipropileno de 50 mL e ao final desta coleta, as células foram lavadas com a adição de PBS 1X, gelado, pH 7.2, q.s.p. para o volume do tubo, e por fim centrifugadas (200 xg/10'/20 °C). O sobrenadante obtido após a centrifugação foi descartado e seguido de lavagem, seguindo processo descrito anteriormente. Por fim, as células foram ressuspendidas, contadas em câmara de Neubauer e condicionadas em nitrogênio líquido.

As amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e colocadas em banho maria à 37 °C por um minuto. Após incubação, as amostras foram lavadas com 10 mL de RPMI, o qual fora aquecido e suplementado, e as amostras centrifugadas a 200 xg por 10 minutos. Este processo foi repetido duas vezes. A seguir, as células foram contadas em câmara de Neubauer. O número de células obtido foi utilizado em microculturas de CMSP e H37Rv.

Para proceder à infecção das CMSP, as bactérias foram diluídas na proporção de 1 bactéria para 1 monócito (MOI de 1:1), MOI (*multiplicity of infection*) partindo do valor das concentrações de leucócitos determinadas e considerando que destes cerca de 10% são monócitos (10^5).

6.6 MICROCULTURAS DE CMSP

Em placas de fundo chato foram adicionados 100 µL de CMSP contendo cerca 1×10^6 de células. As placas foram divididas em duas zonas, o que correspondia ao painel de Treg/memória e outra Treg/proliferação. Cada zona apresentava duas condições: 1) Ctrl: células não infectadas; 2) H37Rv (ATCC® 27294™): 10% do valor de CMSP (concentração 1:1 (bacilo/MΦ)); As amostras foram incubadas por 72 horas a 37 °C/5% CO₂, e após 4 horas foram adicionados 100 µL de RPMI 1640 Suplementado.

6.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO E DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS CMSP

6.7.1 Avaliação do perfil de ativação de células

Foram empregados os marcadores de superfície de linhagem para células T CD8⁺, marcadores de ativação CD25, CD27, CD4Ra e de proliferação Ki-67. Para marcação intracelular as células foram fixadas e permeabilizadas de acordo com o Kit de marcação para *FOXP3-Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) e TBET (Tabela2). A marcação fora realizada incubando cerca de $0,5-1 \times 10^6$ células CMSP em placas de 96 poços, adicionando soluções de concentração ótima (titulada) dos anticorpos na presença de FCS 2% (v/v). Após incubação (30 minutos a 4 °C) as células foram lavadas pela adição de PBS com 2% FCS (v/v) por centrifugação (300 xg, 3 minutos) e ressuspensas em volume apropriado para posterior análise. Todos os resultados foram analisados por citometria de fluxo no Citômetro Attune NxT (Thermo Fisher) e os dados analisados no FlowJo 10.0 (Bd Bioscience).

Tabela 2: Receptores e anticorpos utilizados para as análises fenotípicas

<i>Painel</i>	<i>Canais do Attune NxT</i>						
	BL1	BL2	BL3	BL4	RL1	RL2	RL3
<i>Cores</i>	FITC	PE	PERCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	ALEXA 700	APC Cy7
<i>Memória e regulação</i>	CD45Ra	FOXP3	CD27	TBET	CD8	CD4	CD25
<i>Proliferação e Treg</i>	CD127	FOXP3	Ki-67	TBET	CD8	CD4	CD25
<i>Diluição</i>	1:100	1:30	1:50	1:50	1:100	1:100	1:50

6.7.2 Estratégia de análise

A citometria de fluxo é um método que possibilita a caracterização fenotípica de células. Ao ser canalizada, célula a célula é submetida a um conjunto de lasers, sendo a amplitude da

dispersão da luz variável de acordo com tamanho da célula e o comprimento de onda do laser. A dispersão é verificada por meio de dois detectores ópticos: a dispersão direta, conhecida como FSC (do inglês, *Forward Scatter*), que mede a dispersão ao longo do caminho do laser; e a dispersão lateral SSC (do inglês, *Side Scatter*), que mede a dispersão em um ângulo de 90° em relação ao laser (Figura 4), (BIO-RAD LABORATORIES INC, 2015).

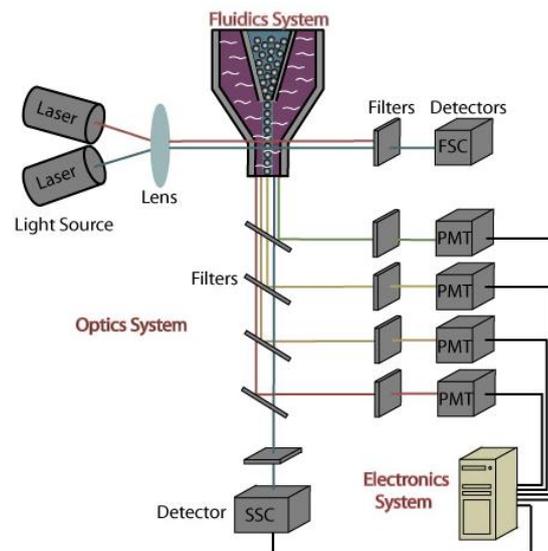


Figura 4: Esquematização de citômetro de fluxo óptico. *BD BioSciences*, 2020.

A estratégia FSC versus SSC é comumente empregado na distinção de populações heterogêneas (Figura 5). O FSC, por sua vez, é capaz de distinguir os agranulócitos que compõem o sistema imunológico: os linfócitos e monócitos. Esses por exibirem tamanho maior, dispersam maior intensidade de luz. Já o SSC fornece informações acerca da complexidade da célula, essencial na discriminação de monócitos e granulócitos do sangue periférico, sendo eles os neutrófilos, eosinófilos e basófilos, caracterizados pela presença de grânulos citoplasmáticos, os quais aumentam a dispersão da luz (BIO-RAD LABORATORIES INC, 2015).

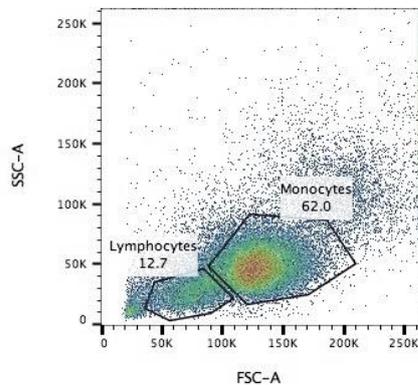


Figura 5: Discriminação de linfócitos e monócitos no FlowJo™

Algumas partículas eventualmente se mantêm próximas ao passar pelo LASER (do inglês, *Ligh Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), sendo esse incapaz de diferenciá-las como partículas individuais. Este evento, a eliminação de células duplas, (do inglês, *doublet discrimination*) é realizada através da seleção de FSC:H altura (do inglês, *height*) versus FCS:A (do inglês, *área*). Outro método de controle essencial na construção de painéis multicores é o emprego do FMO (do inglês, *Fluorescence Minus One*), que consiste na marcação das células de interesse com todos os fluoróforos, menos um, visando a determinação correta dos *gates* (Bio-Rad Laboratories Inc, 2015). Estes ensaios basearam-se na seleção de células empregando FSC: A versus SSC: A, seguida de eliminação de *doublets* e posterior seleção de células CD8⁺. A proliferação celular foi verificada através do emprego de Ki-67 versus FSC: A. Adicionalmente o estado de ativação foi analisado através do emprego do FMO de TBET versus SSC: A (Figura 6).

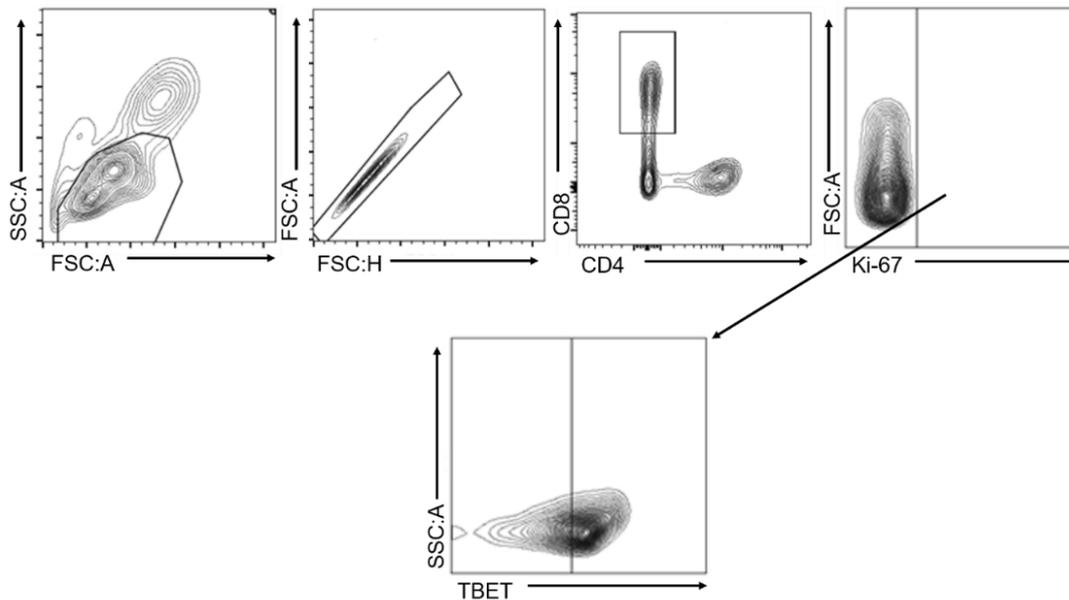


Figura 6: Estratégia de análise de proliferação e ativação de células CD8⁺

A definição de Tregs partiu da seleção de células CD8⁺ seguido de FMO de CD25 versus SSC: A e FMO de FOXP3 versus TBET (Figura 7).

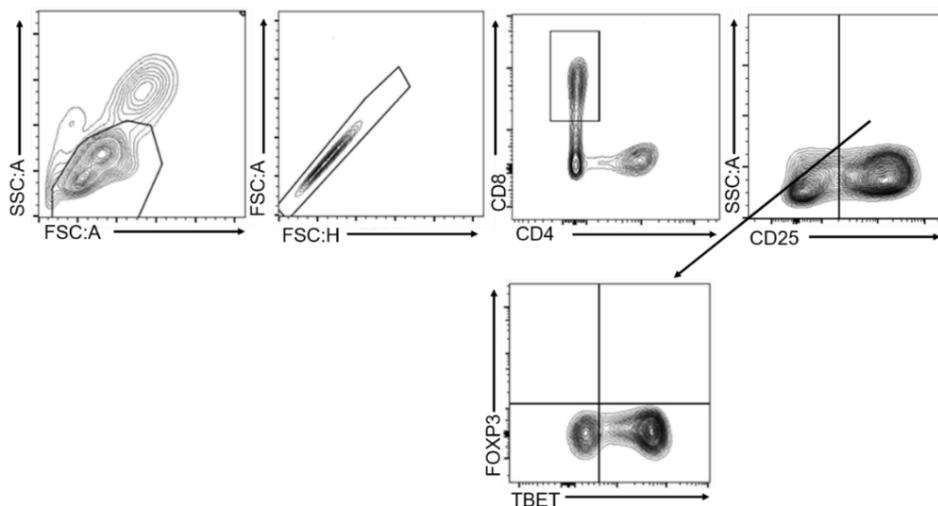


Figura 7: Estratégia de análise para células TCD8⁺ Tregs.

Na definição de populações memória partindo da estratégia inicial de gate foi empregado CD45RA versus CD27, seguido de FMO para FOXP3 versus TBET (Figura 8).

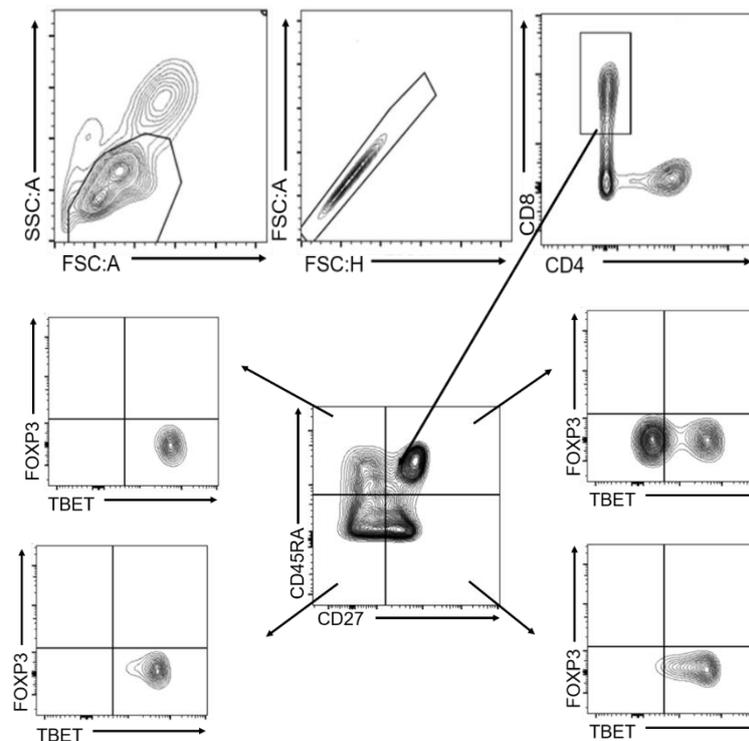


Figura 8: Estratégia de análise para seleção de subpopulações $CD8^+$ T_{NAIVE} ($CD45RA^+CD27^+$), T_{CM} ($CD45RA^-CD27^+$), T_{EM} ($CD45RA^-CD27^-$) e T_{EMRA} ($CD45RA^+CD27^-$)

6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados respeitando as diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa envolvendo seres humanos. Todos os voluntários receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo-A), o qual fora adequadamente explicado e, após aceitação, assinado por uma testemunha e pelo investigador.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência de células $CD8^+$ de memória e reguladoras foram analisadas através dos testes de Kruskal-Wallis com correção de Dunn e Teste T pareado. O software estatístico usado foi o *Prism versão 8* e foram considerados significativos dados com $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

As amostras foram obtidas e conservadas conforme descrito na seção 6.3. Foram arrolados 22 indivíduos, sendo, TST- (n= 7), TST+ (n= 10) e TBa (n= 5), conforme dados demográficos descritos na tabela 4.

Tabela 3: Descrição sumária das amostras

<i>ID</i>	<i>PPD (mm)</i>	<i>QuantiFERON</i>	<i>Idade</i>	<i>CMSP</i>
<i>TST-001</i>	0	Neg	60	16
<i>TST-002</i>	0	Neg	26	18
<i>TST-003</i>	0	Neg	42	22,6
<i>TST-004</i>	0	Neg	57	17,4
<i>TST-005</i>	0	Neg	31	17,4
<i>TST-006</i>	0	Neg	56	18,8
<i>TST-007</i>	0	Neg	60	18
	<i>PPD (mm)</i>	<i>QuantiFERON</i>	<i>Idade</i>	
<i>TST+001</i>	14	Pos	24	23,6
<i>TST+002</i>	19	Pos	35	20,6
<i>TST+003</i>	15	Pos	29	20,2
<i>TST+004</i>	22	Pos	18	26,6
<i>TST+005</i>	19	Pos	52	22,4
<i>TST+006</i>	20	Pos	51	16
<i>TST+007</i>	15	Pos	21	18
<i>TST+008</i>	21	Pos	35	17,6
<i>TST+009</i>	20	Pos	24	18,6
<i>TST+010</i>	15	Pos	28	16,8
	<i>Tuberculose</i>	<i>Baciloscopia</i>	<i>Idade</i>	
<i>TB 001</i>	Pulmonar	3+	42	20,8
<i>TB 002</i>	Pulmonar	3+	37	21,4
<i>TB 003</i>	Pulmonar	3+	20	18
<i>TB 004</i>	Pulmonar	3+	36	18,4
<i>TB 005</i>	Pulmonar	3+	49	20,8

7.1 CÉLULAS CD8⁺

A população de células CD8⁺ foi analisada conforme seção 6.7.2. Logo, não foram observadas diferenças quanto a frequência destas células entre os grupos estudados (Figura 9).

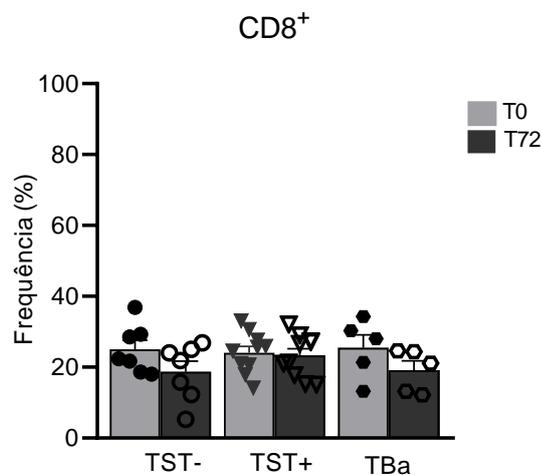


Figura 9: Frequência de células CD8⁺. População total de células CD8⁺ do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado o teste de Kruskal Wallis, com correção de Dunn, e Teste T, sendo *p<0,5; **p<0,01 e ***p<0,001. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7). TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

7.1.1 CD8⁺ TBET⁺

Foi observado alta frequência de células CD8⁺ que expressam o fator de transcrição TBET. Indivíduos TST-, por sua vez, apresentaram maior frequência após infecção quando comparadas a células não infectadas (T0). Por outro lado, indivíduos TST+ apresentaram menor frequência de células CD8⁺ TBET⁺ quando comparadas à indivíduos TST- após infecção por 72 horas (Figura 10).

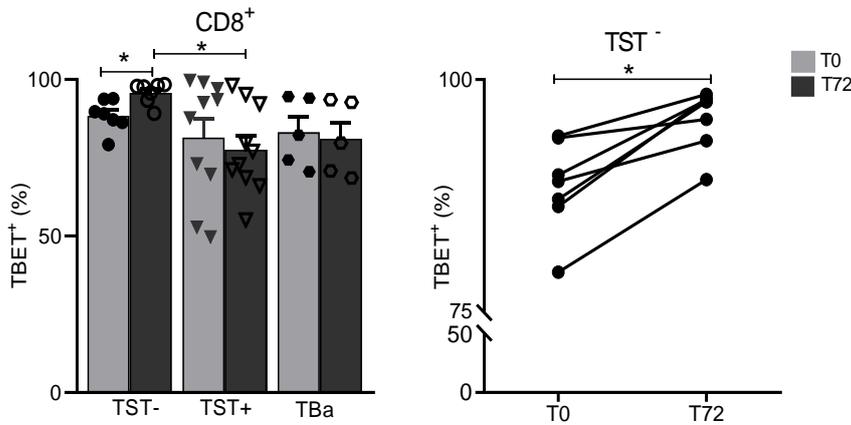


Figura 10: Frequência de células $CD8^+$ que expressam TBET. População de células $CD8^+$ do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, com correção de Dunn, e Teste T, sendo $*p<0,5$; $**p<0,01$ e $***p<0,001$. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7); TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

7.1.2 Proliferação de células $CD8^+$

Foi observada uma menor frequência no grupo não reator após a infecção com a cepa padrão H37Rv (T72h), bem como maior proliferação de $CD8^+$ após infecção com a cepa padrão em TBa, quando comparados a não reatores (Figura 11).

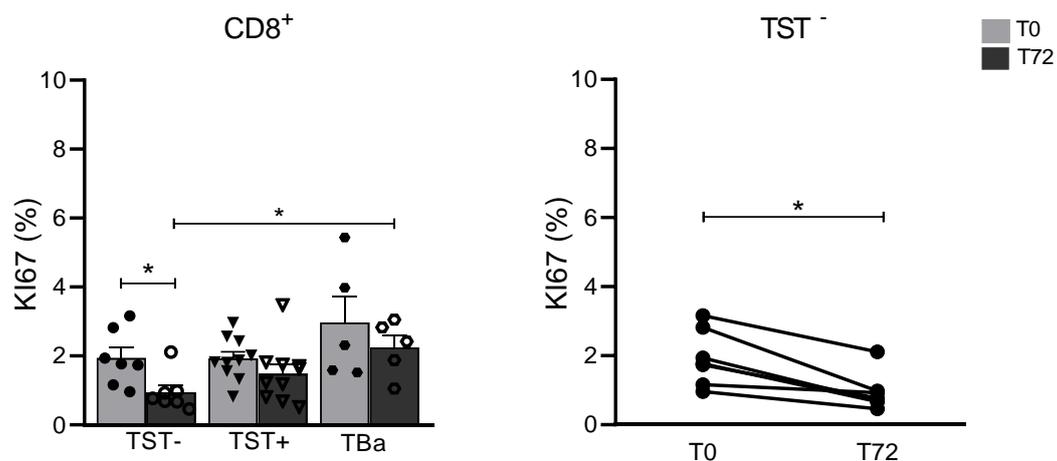


Figura 11: Proliferação de células $CD8^+$ via Ki-67. População de células $CD8^+$ do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado Kruskal Wallis, com correção de Dunn e Teste T, sendo $*p<0,5$; $**p<0,01$ e $***p<0,001$. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7). TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

7.2 CÉLULAS CD8⁺ REGULADORAS

Foi observado aumento na frequência de células reguladoras em indivíduos TBa, quando comparados à TST+ em amostras não infectadas, bem como aumento na frequência de CD8⁺ Treg células em TST+ após infecção, em relação à (T0) (Figura 12).

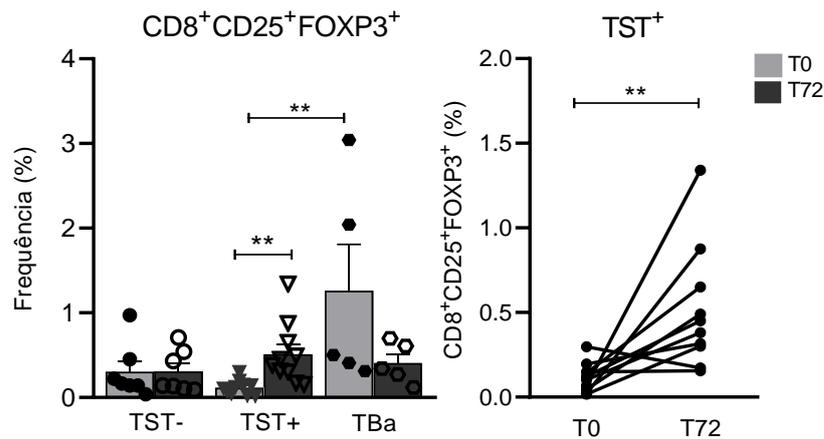


Figura 12: Frequência de CD8⁺ reguladoras. População total de células reguladoras CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e infectadas após 72 horas (T 72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado Kruskal Wallis com correção de Dunn, e Teste T, sendo *p<0,5; **p<0,01 e ***p<0,001. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7); TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

Células CD8⁺ Treg TBET⁺FOXP3⁺ apresentaram maior frequência em TBa, quando comparados a indivíduos TST- em amostras não infectadas. Foi observado aumento na frequência de CD8⁺ Treg TBET⁺FOXP3⁺ em TBa quando comparados a indivíduos TST-, após infecção. Em amostras não infectadas TST+ apresentaram menores frequências de Treg TBET⁺FOXP3⁺ quando comparados à TBa. Ademais, indivíduos TST+ apresentam aumento na frequência pós infecção (T72) quando comparado a células não infectadas (Figura 13).

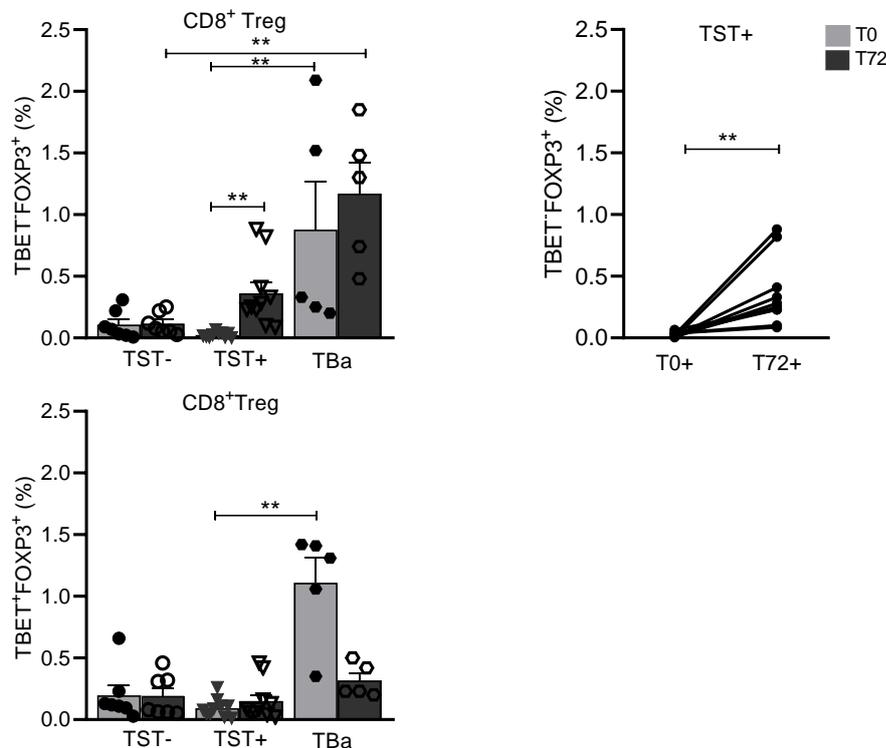


Figura 13: Frequência de CD8⁺ reguladoras TBET⁻FOXP3⁺ e TBET⁺FOXP3⁺. População de células reguladoras do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e infectadas após 72 horas (T 72) com a cepa H37RV. Para análise das populações foi empregado Kruskal Wallis com correção de Dunn e Teste T, sendo *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n = 10); TST+: Teste Tuberculínico positivo (n = 10); TBa: tuberculose (n = 5).

7.3 CÉLULAS CD8⁺ DE MEMÓRIA

A combinação dos marcadores CD45Ra e CD27 possibilitaram a identificação subtipos de células CD8⁺, sendo T_{naive} (CD45RA⁺CD27⁺), T_{EMRA} (CD45RA⁺CD27⁻), T_{EM} (CD45RA⁻CD27⁻) e T_{CM} (CD45RA⁻CD27⁺) (Figura 14). T_{naive} apresentaram maior frequência após infecção (T72) quando comparadas ao T0 em indivíduos TST+. T_{CM} apresentaram maior frequência em TST- em amostras não infectadas quando comparadas a TBa, e redução na frequência de células após infecção. T_{EM} apresentaram maior frequência após infecção em indivíduos TST- quando comparadas à T0, bem como maior frequência pós infecção quando comparadas à TST+. Não foram observadas diferenças significativas na frequência de T_{EMRA} .

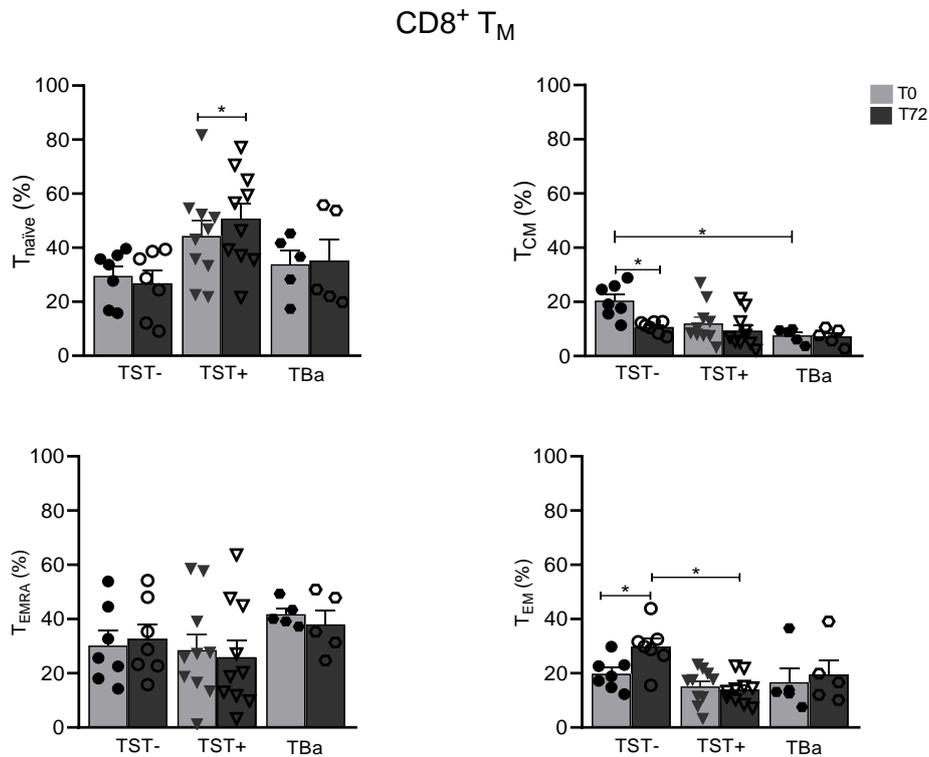


Figura 14: Subpopulações de memória. Frequência de subpopulações de células $CD8^+$ de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado o teste de Kruskal Wallis, com correção de Dunn e Teste T, sendo * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7); TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

7.3.1 Frequência de células T_{naive} do tipo $FOXP3^+$ com e sem expressão de $TBET$

Indivíduos TST- apresentaram aumento na frequência de células *naive* $TBET^+FOXP3^+$ após 72 horas de infecção em relação a células não infectadas (T0). Ademais, indivíduos sensibilizados apontaram maior frequência após infecção (T72) quando comparados à (T0). Na frequência de T_{naive} $TBET^+FOXP3^+$, indivíduos TST- apresentaram aumento na frequência após infecção (Figura 15).

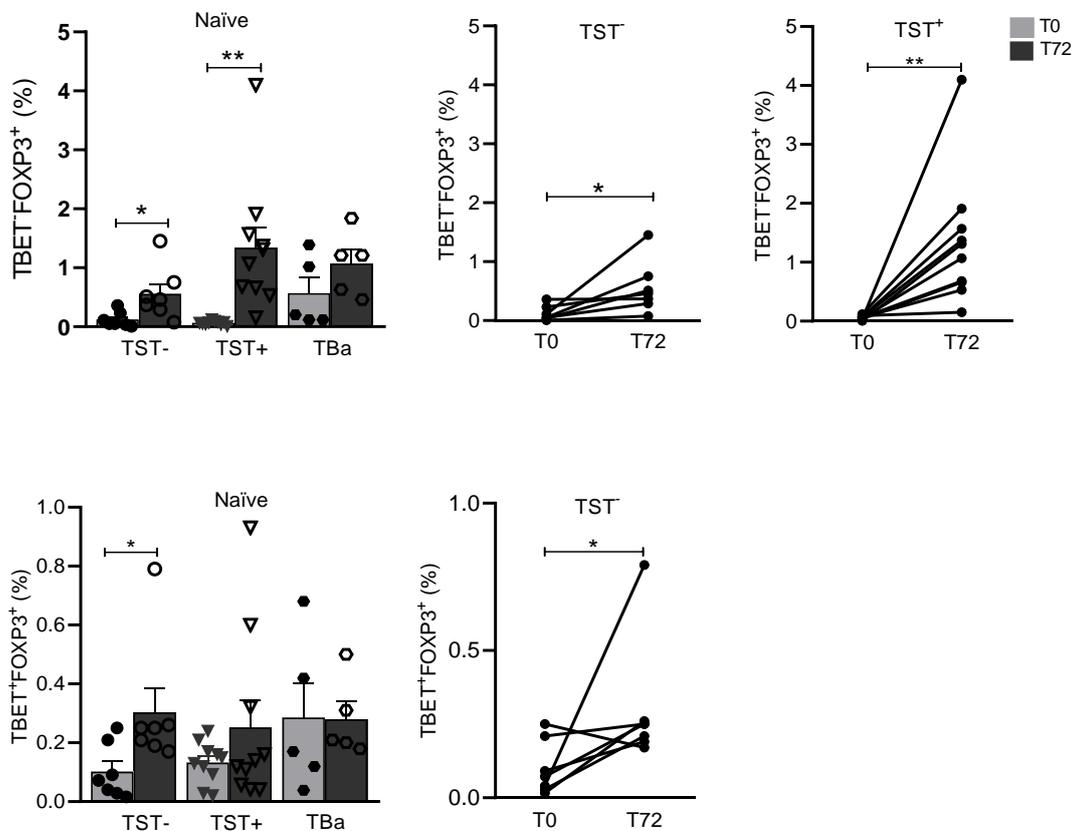


Figura 15: Frequência de células naíve $TBET^+FOXP3^+$ e $TBET^-FOXP3^+$. Subpopulações de células de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção *in vitro* por 72 horas (T72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado o teste de Kruskal Wallis, com correção de Dunn, e Teste T, sendo $*p < 0,5$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7); TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

7.3.2 Frequência de células T_{CM} do tipo $FOXP3^+$ com e sem expressão de $TBET$

Indivíduos TST+ e TST- apresentaram menores frequências de $T_{CM} TBET^- FOXP3^+$ em (T0), quando comparados ao TBa. Foi observado aumento na frequência de $T_{CM} TBET^- FOXP3^+$ em indivíduos TST+ após infecção. Por outro lado, indivíduos TST- apresentaram aumento na frequência de após 72 horas de infecção em células $T_{CM} TBET^+ FOXP3^+$ (Figura 16).

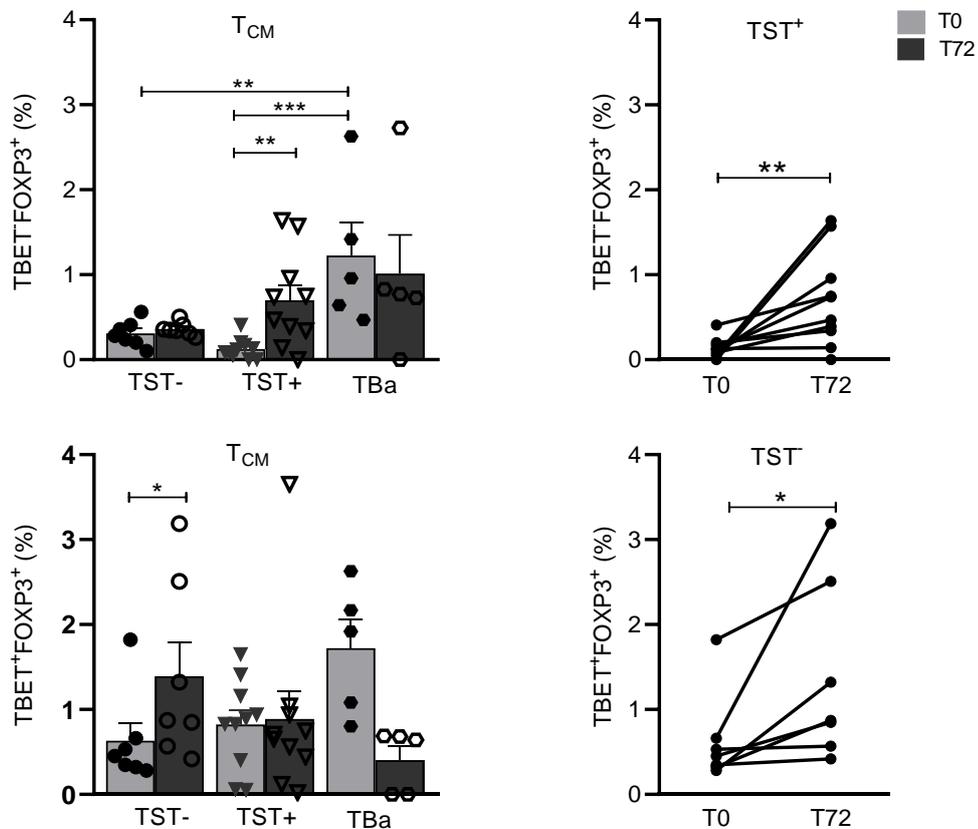


Figura 16: Frequência de $T_{CM} TBET^+FOXP3^+$ e $TBET^+FOXP3^+$. Subpopulações de células de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção *in vitro* por 72 horas (T72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado o teste de Kruskal Wallis, com correção de Dunn, e Teste T, sendo * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7); TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

7.3.3 Frequência de células T_{EM} do tipo $FOXP3^+$ com e sem expressão de $TBET$

Foi observado diminuição na frequência de células $T_{EM} TBET^+FOXP3^+$ em amostras infectadas (T72) quando comparadas a células não infectadas (T0) em indivíduos portadores da TBa. Células $T_{EM} TBET^+FOXP3^+$, por outro lado, em indivíduos sensibilizados, apresentaram aumento na frequência após infecção. Ademais, fora observada diferença significativa entre amostras não infectadas (T0) nos grupos TST- e TST+ (Figura 17).

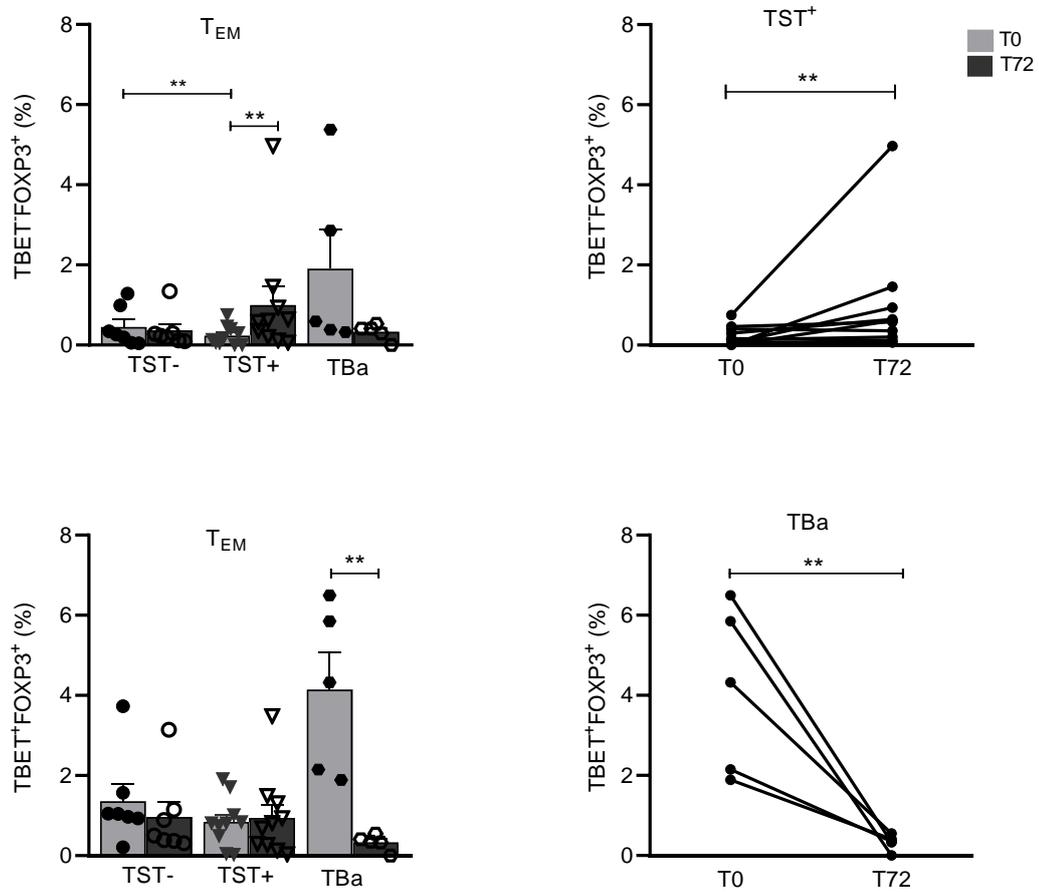


Figura 17: Frequência de T_{EM} $TBET^{-}$ $FOXP3^{+}$ e $TBET^{+}$ $FOXP3^{+}$. Subpopulações de células de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção *in vitro* por 72 horas (T72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado o teste de Kruskal Wallis, com correção de Dunn, e Teste T, sendo * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7); TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

7.3.4 Frequência de células T_{EMRA} do tipo $FOXP3^{+}$ com e sem expressão de $TBET$

Não foram observadas diferenças significativas na frequência de células T_{EMRA} $TBET^{+}$ $FOXP3^{+}$. Células T_{EMRA} $TBET^{-}$ $FOXP3^{+}$ apresentaram maior frequência após infecção no grupo sensibilizado quando comparadas a células não infectadas (T0), (Figura 18)

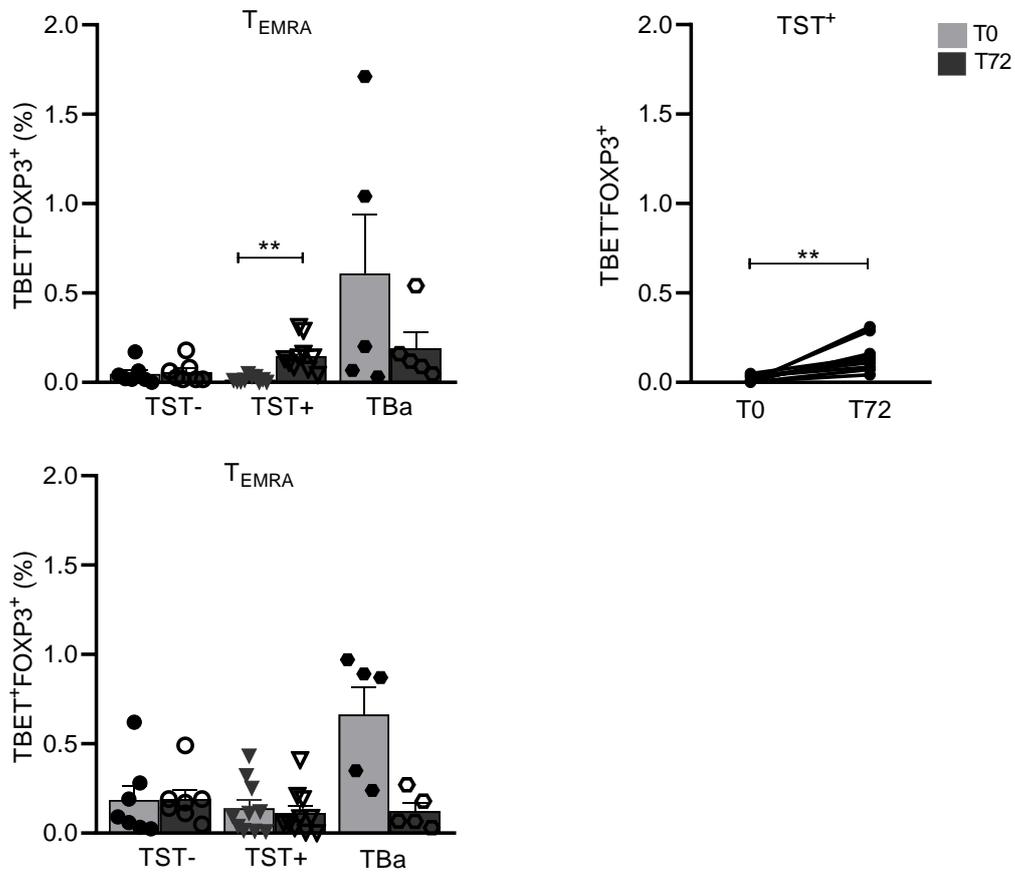


Figura 18: Frequência de T_{EMRA} TBET⁻ FOXP3⁺ e TBET⁺ FOXP3⁺. Subpopulações de células de memória do sangue periférico em amostras não infectadas (T0) e após infecção in vitro por 72 horas (T72) com a cepa H37RV. Para análise estatística foi empregado o teste de Kruskal Wallis com correção de Dunn, e Teste T, sendo *p<0,5; **p<0,01 e ***p<0,001. TST-: Teste Tuberculínico negativo (n=7); TST+: Teste Tuberculínico positivo (n=10); TBa: Tuberculose pulmonar ativa (n=5).

8 DISCUSSÃO

O *Mtb*, agente causador da TB, é responsável pela indução de exacerbada resposta imunológica associada a dano tecidual (Casadevall; Pirofski, 2003). Uma vez que a progressão da LTBI para TBa tem sido associada a fatores de risco, como má nutrição e coinfeção com o HIV, pouco sabe-se por que indivíduos aparentemente saudáveis desenvolvem a doença. É hipotetizado que o desdobramento de resposta efetiva nos estágios iniciais da infecção seria essencial no controle do *Mtb* – uma vez que uma resposta tênue poderia beneficiar a disseminação do bacilo – e o desenvolvimento de inflamação excessiva nos estágios mais tardios da infecção seria prejudicial, com consequente surgimento das lesões características da TB (CARDONA; CARDONA, 2019; CASADEVALL; PIROFSKI, 2003).

Esse estudo propôs analisar a frequência de células CD8⁺ Tregs e de memória do sangue periférico de pacientes portadores da forma pulmonar da doença e reativos ou não ao PPD, com o objetivo de compreender o papel e a dinâmica destas células no contexto da TB. Inicialmente, acreditava-se que células CD8 exerciam papel de pouco destaque em relação a células CD4 durante infecções pelo *Mtb*. Capazes de produzir IL-2, IFN- γ e TNF, células CD8⁺ eliminam bacilos através da produção de granulolisima (Stenger et al., 1998), destroem células infectadas por meio da produção de perforinas e granzimas, ou induzem a apoptose via receptores de membrana do tipo Fas (Fas – FasL) (Lin; Flynn, 2015). Caccamo et al., 2009 empregaram diferentes peptídeos objetivando determinar a frequência de células CD8⁺ epítipo-específicas durante a TBa. Entre os resultados obtidos, os autores relataram menor frequência de CD8⁺ específicas durante a TBa em comparação com indivíduos LTBI, sendo maior naqueles que foram tratados. Entretanto, neste estudo não foi constatada diferença significativa na frequência de células CD8⁺ após infecção com a cepa H37RV nos grupos analisados. Uma vez analisada a resposta de células CD8 à infecção pela cepa H37RV, propusemos analisar a expressão de TBET destas células.

Observamos que indivíduos TST- apresentaram maior frequência de células CD8⁺TBET⁺ após a infecção. Foi hipotetizado que o aumento na frequência destas células após infecção com o *Mtb* estaria relacionado à eliminação dos bacilos. Conhecido como fator de transcrição do tipo TH1, o INF- γ produzido por células CD8 é essencial no controle de patógenos microbianos (Hu et al., 2012) e na produção de moléculas citolíticas, induzindo

apoptose de células infectadas (Tonaco et al., 2017). Neste estudo, indivíduos TBa apresentaram menor frequência de células CD8⁺TBET⁺ quando comparadas a indivíduos TST. Joosten et al., 2007 promoveram a estimulação de amostras de indivíduos TST- e TST+ com bacilo Calmette, sendo observada expansão de células CD8⁺ no grupo TST+. Caccamo et al., 2009, por outro lado, atribuíram a baixa frequência de células CD8 à incapacidade de indivíduos TBa em promover a contenção do *Mtb* in vivo com consequente estimulação crônica, induzindo a apoptose nas células T.

Yang et al., 2015 demonstraram que a frequência de células TBET⁺ em linfócitos CD3⁺CD4⁺ em indivíduos portadores de TBa, PPD- e PPD+ foi similar antes e após a estimulação com *lisado* do *Mtb*. Kurktschiev et al., 2014, baseados em modelo de infecção pelo HCV, demonstraram que a expressão de TBET poderia ser relacionada à resolução espontânea da doença. Seus achados apontam que a frequência de células CD8⁺TBET⁺ foi maior naqueles pacientes que apresentaram resolução espontânea da doença, quando comparados àqueles que desenvolviam infecção crônica. Ademais, a caracterização dos níveis de expressão de TBET em células CD8 específicas durante seis meses apontou que a frequência destas células decaía gradualmente de 73,1% para 40,3% e 21,8% do início da fase aguda (t1) para 1-3 (t2), 3-6 (t3) meses, respectivamente.

Nesse sentido, presume-se que a redução de células CD8⁺TBET⁺ observada em indivíduos TBa seja justificada pela cronicidade da doença, acarretando a geração de células com reduzida capacidade citolítica, já que a expressão de proteínas como PD-1 (do inglês, *Programmed Cell Death 1*), TIGIT (do inglês, *Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains*) ITGAM (do inglês, *Integrin Alpha M*), e IL18 (do inglês, *Interleukin 18 Receptor*) são mais impactadas pela deficiência de TBET em infecções crônicas (Doering et al., 2012). Nesse sentido, a persistência do patógeno em doenças de caráter crônico seria capaz de afetar a funcionalidade destas células, gerando células exaustas (SHIN; WHERRY, 2007).

Para obtenção de resultados mais consistentes, foi empregado o Ki-67 como marcador de proliferação (Gerdes et al., 1984). Neste estudo, relatamos aumento na frequência de células CD8⁺ específicas em TBa e diminuição na frequência de células no grupo TST-. Day et al., 2014 relataram maior expressão de Ki-67 em células CD8⁺ IFN- γ ⁺ CFP-10/ESAT-6 antígeno-específicas em pacientes portadores de TB quando comparados a LTBI, sugerindo que a

modulação na expressão de Ki-67 ocorre em pacientes com a doença ativa, exibindo células ativadas no cenário de alta carga bacteriana.

Neste trabalho reportamos o aumento na frequência de células reguladoras em indivíduos TBa quando comparados à TST+ em amostras não infectadas, bem como aumento na frequência de CD8⁺ Treg células em TST+ após infecção. Resultados de Stringari (2012) demonstram um aumento de Tregs em indivíduos TST+ e TBa. Segundo Levine et al., (2017), a perda da função ou eliminação de Tregs que expressam TBET resulta em severa autoimunidade.

Guyot-revol et al., 2006 reportaram aumento na porcentagem de células reguladoras em fluidos do pericárdio e pleura, quando comparados com ao CMSP de indivíduos portadores de TBa. Boer et al., 2014 demonstraram que a presença do BCG ativou células CD8⁺ Tregs em indivíduos TST+, sugerindo que a presença de Tregs poderia contribuir no insucesso da imunização contra a TBa em adultos.

Reportado por Joosten et al., 2007, a estimulação de CMSP de indivíduos PPD- com o bacilo Calmette não foi capaz de induzir a produção de células reguladoras, indicando que in vivo a apresentação de antígenos é necessária na ativação da atividade supressora das Tregs. Apesar de reconhecer os mesmos epítomos de células CD4 efectoras, Tregs são originadas de células tímicas que exibem TCR distinto destas células (Urdahl, 2014). Logo, a presença de Tregs no sítio da infecção promoveriam retardo na apresentação de antígenos micobacterianos pois restringem a expansão de células efectoras, estabilizando um nicho para infecção crônica.

Neste estudo, o aumento na frequência de CD8⁺Tregs TBET⁻FOXP3⁺ foi significativamente maior em amostras de TBa infectadas do que de indivíduos TST-. Ademais, indivíduos TBa apresentavam maior frequência de CD8⁺Tregs TBET⁺FOXP3⁺ que TST- em amostras não infectadas (T0), que in vivo constituiria um nicho de infecção em decorrência da imunossupressão e da produção de INF- γ por populações TBET⁺ (KOCH ET AL., 2009).

Resultados de Boer et al., 2014 sugerem que a apresentação de antígenos via MHC-I estaria envolvida na ativação das Tregs, uma vez que a atividade de CD8⁺ Treg foi induzida por bacilos vivos após desafio. Os autores enfatizam que a apresentação cruzada de bactérias

atenuadas a células seria insuficiente, levando à hipótese de que o BCG, uma bactéria intracelular viva, seria capaz de modificar a via de apresentação.

Observação semelhante foi feita por Akkaya et al., (2019) ao propor que a existência de competição antígeno-específica *in vivo* entre iTregs e DC's impedia a apresentação destes antígenos a células *naïve*. Após 72 horas de transferência em estudos de proliferação, observou-se uma fraca inibição na proliferação de $T_{naïve}$ na presença de células ativadas, ao passo que uma forte inibição ocorria na presença de células iTreg. Esses resultados demonstram que a inibição na proliferação de células T se dava devido à presença de células iTreg antígeno-específicas devido ao contato entre Tregs e DC's.

Além do mais, a combinação dos marcadores CD45Ra e CD27 possibilitaram a identificação de subtipos de memória. Em relação a células $CD8^+ T_{naïve}$, T_{CM} , T_{EM} e T_{EMRA} , observou-se que indivíduos TST+ apresentaram maior frequência de $T_{naïve}$ após infecção com a cepa HR37RV quando comparadas a células não infectadas. Marín et al., 2012 relataram correlação negativa na frequência de células $T_{naïve}$ e T_{CM} em pacientes TST+, fato não observado em indivíduos TBa e no grupo controle, sugerindo a existência de um mecanismo compensatório, uma vez que o desenvolvimento de TBa levaria à redução na proporção de células T_{CM} circulantes e aumento de células $T_{naïve}$.

Tonaco et al., 2017 analisaram a resposta anti-*Mtb*, bem como a produção de citocinas por $CD8^+ T_{naïve}$, T_{EMRA} , T_{CM} e T_{EM} em amostras estimuladas e não estimuladas pela cepa H37RV por 144 horas. Entre os resultados observados, os controles e os indivíduos TST+ não apresentaram aumento significativo no fenótipo de memória após estimulação *in vitro*. Diferentemente dos dados observados pelo autor, os ensaios aqui demonstrados, indivíduos TST- apresentaram maior frequência de células T_{CM} em amostras não infectadas quando comparadas a TBa, e redução na frequência de células após infecção.

A geração deficiente de células T_{CM} induzida por células efectoras e exaustas foi relatada por Lanzavecchia; Sallusto, 2005. Segundo os autores, a interação entre o TCR, citocinas e DC's maduras culminaria em uma robusta estimulação antigênica, com consequente eliminação do antígeno e geração de células T_{EM} e T_{CM} em diferentes estágios de diferenciação. Em contrapartida, em infecções de caráter crônico, a persistência do antígeno levaria à proliferação

contínua e diferenciação terminal de todas as células T, reprimindo a geração de células T_{CM}, já que a estimulação não foi cessada. Desta forma, na TBa, a estimulação crônica das células T a antígenos bacterianos levaria à redução na frequência de T_{CM} circulantes (MARÍN et al., 2012).

T_{EM} são capazes de evadir tecidos periféricos e induzir a eliminação de patógeno através de atividade citotóxica e secreção de citocinas (Henson; Riddell; Akbar, 2012). Sabe-se que células T_{EM} estão envolvidas em respostas imediatas (Lanzavecchia; Sallusto, 2005), sendo que após o controle da infecção e eliminação do antígeno, cerca de 90% destas morrem por apoptose. Neste estudo, indivíduos TST- apresentaram maior frequência de células T_{EM} após infecção, sendo esta superior quando comparadas a indivíduos TST+ nas mesmas condições.

A diferenciação de células T pode ser definida pela expressão de CD27 e CD45RA, sendo consideradas altamente diferenciadas ao exibir CD45RA⁺CD27⁻CD28⁻. Uma vez reexpresso o CD45RA, células CD8 são capazes de exibir atividade citotóxica após ativação e, por não expressarem receptores de migração, é suposto que estas populações não sejam capazes de migrar aos LN (Henson; Riddell; Akbar, 2012). Neste estudo, após estimulação com a cepa H37RV, não foram observadas alterações na frequência de T_{EMRA}. Em contrapartida, Caccamo et al., 2009, através do emprego de ESAT-6, Ag85B, Hsp65, Rv1614, Rv1490 e 16kD, independente do antígeno utilizado como estímulo, observou que cerca de 60% e 35% das células CD8 específicas expressavam a isoforma CD45RA em indivíduos LTBI e TBa, respectivamente, indicando fenótipo terminalmente diferenciado.

Ressaltamos que a discrepância observada na resposta específica ao *Mtb* pode ser justificada, uma vez que a ativação destas células depende do antígeno empregado (Jasenosky et al., 2015). Logo, acredita-se que durante a infecção pelo *Mtb*, a população de células TCD8⁺ específicas mantenham um estágio intermediário de diferenciação, caracterizado pela redução do potencial proliferativo e consequente diminuição da atividade citotóxica (Caccamo et al., 2009; Jasenosky et al., 2015). Ressaltamos que a análise aprofundada de receptores de exaustão e expressão gênica se faz necessária, uma vez que esta não foi efetuada em nossos estudos.

Posteriormente, propusemos avaliar a expressão concomitante de TBET e FOXP3 em populações de memória. Sabe-se que em células CD4⁺, a expressão de TBET e FOXP3 exercem funções distintas e opostas. Reportado por Koch et al., (2009), ligado ao locus *ifng*, o TBET é

essencial na produção de INF- γ , ao passo que a expressão de FOXP3 pode suprimir a expressão de INF- γ . Neste estudo, indivíduos TST- apresentaram aumento da frequência de células T_{naive} e $T_{CM} TBET^+FOXP3^+$ após infecção, ao passo que indivíduos TBa apresentaram redução na frequência de células $T_{EM} TBET^+FOXP3^+$ em ensaio similar. Em indivíduos TST-, a expansão de T_{EM} e T_{CM} é essencial na proteção do hospedeiro, já que células $TBET^+$ são capazes de produzir INF- γ , com conseqüente contenção do bacilo (Hu et al., 2012). Durante a TBa, T_{EM} antígeno-específicas exibiram reduzida capacidade citolítica, com incapacidade de conter a infecção (JASENOSKY et al., 2015).

Em estudos desenvolvidos por Urdahl (2014), metade das células CD4 *Mtb*-específicas isoladas de pulmões eram derivadas de tecidos vasculares associados aos pulmões aos invés do parênquima dos pulmões. No tecido, as células T específicas exibiram alta expressão de TBET e uma robusta produção de INF- γ , ao passo que as células dos parênquimas expressaram níveis intermediários de TBET e INF- γ . Ao transferir células do tecido vascular para outro indivíduo infectado, estas células exibiram uma fraca capacidade de migrar aos pulmões e desempenhar proteção (SAKAI et al., 2014; URDAHL, 2014).

Neste estudo, observamos que indivíduos TST+ apresentam aumento na frequência de células T_{naive} , T_{CM} , T_{EM} , $T_{EMRA} TBET^-FOXP3^+$, ao passo que indivíduos TST- apresentam maior frequência de células $T_{naive} TBET^-FOXP3^+$ após a infecção. Indivíduos TBa apresentam maior frequência de células $T_{CM} TBET^-FOXP3^+$ sendo observada redução gradual nos grupos TST- e TST+, respectivamente, em amostras não infectadas. Koch et al., 2009, visando examinar a produção de INF- γ em esplenócitos de *Foxp3* após estimulação in vitro com PMA e ionomicina, verificaram que uma pequena população de células $TBET^+FOXP3^+$ era capaz de produzir INF- γ , ao passo que em células $FOXP3^-$ a produção de INF- γ fora restrita a populações $TBET^+$. Nesse sentido, infere-se que a expressão de FOXP3 e a produção de citocinas supressoras estaria atrelado a capacidade de conter a proliferação do bacilo no local da infecção, uma vez que a produção de INF- γ poderia restringir-se a populações $TBET^+$.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados reportam aumento na frequência de células CD8 com fenótipo regulador em indivíduos portadores da doença e sensibilizados (LTBI). A presença de destas células reguladoras nos sítios da infecção podem promover retardo na apresentação de antígenos do *Mtb*, restringindo a expansão de células efetoras e contribuindo para a cronicidade da infecção, e conseqüentemente, contribuindo para dano tecidual. Corroborando com esta hipótese, durante a doença ativa, células CD8⁺ apresentaram redução na capacidade proliferativa decorrente da estimulação contínua. Como consequência, a geração de células de memória seria prejudicada, já que o estímulo não foi cessado, além de poderem exibir reduzida capacidade citolítica, uma vez que a persistência do bacilo seria capaz de afetar a funcionalidade destas células levando à exaustão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI, J. W. et al. Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. **Emerging microbes & infections**, v. 5, n. November 2015, p. e10, 2016.

AKKAYA, B. et al. Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 20, n. 2, p. 218–231, 1 fev. 2019.

ANGELOSANTO, J. M.; WHERRY, E. J. Transcription factor regulation of CD8+ T-cell memory and exhaustion. **Immunological Reviews**, v. 236, n. 1, p. 167–175, 2010.

APPAY, V. et al. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. **Cytometry Part A**, v. 73, n. 11, p. 975–983, 2008.

ARIEL, S.; SEBASTIAN, A. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. **Immunological Reviews**, v. 219, n. 1, p. 143–156, 2007.

AUGUSTE, P. et al. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: Systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 9 mar. 2017.

AXELSSON-ROBERTSON, R. et al. Frequency of Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T-cells in the course of anti-tuberculosis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 32, p. 23–29, 2015.

BAÑULS, A. L. et al. Mycobacterium tuberculosis: Ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1261–1269, 2015.

BEHR, F. M. et al. Armed and Ready: Transcriptional Regulation of Tissue-Resident Memory CD8 T Cells. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. July, p. 1770, 2018.

BEHR, M. A. et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. **Lancet**, v. 353, n. 9151, p. 444–449, 1999.

BIO-RAD LABORATORIES INC. Flow Cytometry - Basics Guide. **Bio-Rad Laboratories Inc**, p. 48, 2015.

BOCIAN, K. et al. Expanding Diversity and Common Goal of Regulatory T and B Cells. I: Origin, Phenotype, Mechanisms. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 6, p. 501–520, 5 dez. 2017.

BOER, M. C. et al. CD39 is involved in mediating suppression by Mycobacterium bovis BCG-activated human CD8+CD39+ regulatory T cells. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 7, p. 1925–1932, 2013.

BOER, M. C. et al. CD8⁺ regulatory T cells, and not CD4⁺ T cells, dominate suppressive phenotype and function after in vitro live *Mycobacterium bovis*-BCG activation of human cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–8, 2014.

BRASIL.; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica**. 1^a edição ed. Brasília/DF: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2014.

BRENNAN, P. J. The Envelope of Mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 29–63, 1 jan. 1995.

BRIGHENTI, S.; ANDERSSON, J. Local Immune Responses in Human Tuberculosis: Learning From the Site of Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. suppl_2, p. S316–S324, 15 maio 2012.

BUNNEY, P. E. et al. Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. **Physiology & Behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, jul. 2017.

BURL, S. et al. FOXP3 gene expression in a tuberculosis case contact study. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 1, p. 117–122, 2007.

CACCAMO, N. et al. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8 T-cells in patients with active tuberculosis and in individuals with latent infection. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. 1–10, 2009.

CALLIGARO, G. L. et al. Effect of new tuberculosis diagnostic technologies on community-based intensified case finding: a multicentre randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 441–450, 2017.

CARDONA, P.; CARDONA, P.-J. Regulatory T Cells in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. September, p. 1–11, 11 set. 2019.

CARRANZA, C. et al. *Mycobacterium tuberculosis* growth control by lung macrophages and CD8 cells from patient contacts. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 2, p. 238–245, 2006.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17–24, out. 2003.

CHURCHYARD, G. et al. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_6, p. S629–S635, 3 nov. 2017.

CHURLAUD, G. et al. Human and mouse CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAR, p. 2–11, 2015.

COBB, D. et al. T-bet-dependent regulation of CD8⁺ T-cell expansion during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 128, n. 4, p. 589–599, 2009.

DAY, C. L. et al. Patients with Tuberculosis Disease Have Mycobacterium tuberculosis-Specific CD8 T Cells with a Pro-Apoptotic Phenotype and Impaired Proliferative Capacity , Which Is Not Restored following Treatment. v. 9, n. 4, p. 1–12, 2014.

DOERING, T. A. et al. Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8⁺ T Cell Exhaustion versus Memory. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1130–1144, dez. 2012.

DONOGHUE, H. D. Paleomicrobiology of Human Tuberculosis. **Paleomicrobiology of Humans**, v. 003, n. 1, p. 113–130, 2016.

DZULKIFLI, F. A.; MASHOR, M. Y.; X, H. An overview of recent counting methods for Ki67 IHC staining. **J. of Biomed. & Clin. Sci**, v. 3, n. 2, p. 10–17, 2018.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 581–591, 13 ago. 2012.

FERREIRA, T. F. et al. Diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: Tuberculin test versus interferon-gamma release. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 724–730, 2015.

GANBAT, D. et al. Mycobacteria infect different cell types in the human lung and cause species dependent cellular changes in infected cells. **BMC Pulmonary Medicine**, p. 1–16, 2016.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 514–532, maio 2012.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **The Journal of Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1710–1715, 1984.

GERSHON, R. K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, v. 18, n. 5, p. 723–37, 1970.

GUYOT-REVOL, V. et al. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 7, p. 803–810, 2006.

HARRIS, J. et al. T Helper 2 Cytokines Inhibit Autophagic Control of Intracellular Mycobacterium tuberculosis. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 505–517, set. 2007.

HENSON, S. M.; RIDDELL, N. E.; AKBAR, A. N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 4, p. 476–481, 2012.

HORI, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057–1061, 14 fev. 2003.

HORI, S.; SAKAGUCHI, S. Foxp3: A critical regulator of the development and function of regulatory T cells. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 8, p. 745–751, 2004.

HOUBEN, R. M. G. J.; DODD, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. **PLoS Medicine**, v. 13, n. 10, 2016.

HU, D. et al. T-bet acts as a powerful adjuvant in Ag85B DNA-based vaccination against tuberculosis. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 1, p. 139–144, 2012.

HUNTER, R. L. The pathogenesis of tuberculosis: The early infiltrate of post-primary (adult pulmonary) tuberculosis: A distinct disease entity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. SEP, p. 1–9, 2018.

JACKSON, M. The Mycobacterial Cell Envelope--Lipids. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 10, p. a021105–a021105, 1 out. 2014.

JASENOSKY, L. D. et al. T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 74–87, 2015.

JOOSTEN, S. A. et al. Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 19, p. 8029–8034, 2007.

KOCH, M. A. et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. **Nature Immunology**, v. 10, n. 6, p. 595–602, 2009.

KURACHI, M. CD8 + T cell exhaustion. **Seminars in Immunopathology**, v. 41, n. 3, p. 327–337, 2019.

KURKTSCHIEV, P. D. et al. Dysfunctional CD8+ T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 10, p. 2047–2059, 22 set. 2014.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 3, p. 326–332, 2005.

LAZAREVIC, V.; GLIMCHER, L. H.; LORD, G. M. T-bet: a bridge between innate and

adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 11, p. 777–789, 11 nov. 2013.

LEVINE, A. G. et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 421–425, 7 jun. 2017.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 239–249, 28 maio 2015.

LIPP, M. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials. v. 401, n. October, 1999.

LIPWORTH, S. et al. Defining dormancy in mycobacterial disease. **Tuberculosis**, v. 99, p. 131–142, jul. 2016.

LU, Y. et al. Expansion of CD4⁺CD25⁺ and CD25⁻ T-Bet, GATA-3, Foxp3 and ROR γ t Cells in Allergic Inflammation, Local Lung Distribution and Chemokine Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19889, 19 maio 2011.

LUO, J. et al. Imbalance of Th17 and Treg in peripheral blood mononuclear cells of active tuberculosis patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 155–161, 2017.

MARIEKE et al. CXCR4, but not CXCR3, drives CD8 + T-cell entry into and migration through the murine bone marrow. **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 4, p. 576–589, 2019.

MARÍN, N. D. et al. Reduced frequency of memory T cells and increased Th17 responses in patients with active tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1667–1676, 2012.

MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. Defining memory CD8 T cell. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, p. 1–10, 2018.

MENDEZ-SAMPERIO, P. Modulation of tuberculosis-related immune responses by helminths. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 141–144, abr. 2014.

MIYARA, M. et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. **Immunity**, v. 30, n. 6, p. 899–911, jun. 2009.

MORO-GARCÍA, M. A. et al. Influence of inflammation in the process of T lymphocyte differentiation: Proliferative, metabolic, and oxidative changes. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, 2018.

MORRISON, J.; PAI, M.; HOPEWELL, P. C. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income

countries : a systematic review and meta-analysis. p. 359–368, 2008.

NARDELL, E. A. Transmission and institutional infection control of tuberculosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2016.

NUNES, E. A. et al. Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacterial isolates among patients with recent HIV infection in Mozambique. **Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 34, n. 10, p. 822–8, 2008.

ODERUP, C. et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. **Immunology**, v. 118, n. 2, p. 240–249, 2006.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16076, 27 out. 2016.

PATHAK, S. K. et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nature Immunology**, v. 8, n. 6, p. 610–618, 2007.

PERDOMO, C. et al. Mucosal BCG Vaccination Induces Protective Lung-Resident Memory T Cell Populations against Tuberculosis. **mBio**, v. 7, n. 6, p. 1–11, 2016.

PEREIRA, L. M. S. et al. Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of Immune Homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, p. 1–24, 26 maio 2017.

QUEVAL, C. J. et al. Mycobacterium tuberculosis Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. **Cell Reports**, v. 20, n. 13, p. 3188–3198, 2017.

RATAJCZAK, W. et al. Immunological memory cells. **Central European Journal of Immunology**, v. 43, n. 2, p. 194–203, 2018.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. A role for CD4+ CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 144, n. 1, p. 25–34, 2006.

RILEY, R. L. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. **American review of tuberculosis**, v. 76, n. 6, p. 931–941, 1957.

ROSENBLUM, M. D.; WAY, S. S.; ABBAS, A. K. Regulatory T cell memory. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2, p. 90–101, 21 fev. 2016.

RYAN P. LARSON; SHAHIN SHAFIANI; KEVIN B. URDAHL. Foxp3+ Regulatory T Cells in Tuberculosis. **The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis , Advances in**

Experimental Medicine and Biology, v. 783, 2013.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 3, p. 1151–64, 1995.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self tolerance and negative control of immune response. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 531–562, abr. 2004.

SAKAI, S. et al. Cutting Edge: Control of Mycobacterium tuberculosis Infection by a Subset of Lung Parenchyma–Homing CD4 T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 7, p. 2965–2969, 1 abr. 2014.

SALES GIL, R.; VAGNARELLI, P. Ki-67: More Hidden behind a ‘Classic Proliferation Marker’. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 10, p. 747–748, 2018.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 374–380, ago. 2005.

SAMET, J. M. How Do We Catch Colds? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 11, p. 1175–1176, 2004.

SAMJI, T.; KHANNA, K. M. Understanding memory CD8 + T cells. **Immunology Letters**, v. 185, p. 32–39, maio 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim epidemiológico. **Ministério da Saúde**, v. 49, n. 11, 2018.

SERRANO, C. J. et al. Regulatory T-cell subsets in response to specific Mycobacterium tuberculosis antigens in vitro distinguish among individuals with different QTF and TST reactivity. **Clinical Immunology**, v. 157, n. 2, p. 145–155, abr. 2015.

SHIN, H.; WHERRY, E. J. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 408–415, 2007.

SIMMONS, J. D. et al. Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 9, p. 575–589, 12 set. 2018.

SINGH, S. et al. Rv2626c and Rv2032 activate TH1 response and downregulate regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 62, p. 46–53, 2019.

SOARES, A. et al. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. **Journal of Immunological Methods**, v. 362, n. 1–2, p. 43–50, 2010.

SQUEGLIA, F. et al. A structural overview of mycobacterial adhesins: Key biomarkers for diagnostics and therapeutics. **Protein Science**, v. 27, n. 2, p. 369–380, 2018.

STEK, C. et al. The Immune Mechanisms of Lung Parenchymal Damage in Tuberculosis and the Role of Host-Directed Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–16, 2018.

STENGER, S. et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science**, v. 282, n. 5386, p. 121–125, 1998.

STRINGARI, L. **Influência de células T reguladoras na atividade microbicida de pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis com teste tuberculínico positivo e negativo frente ao desafio com cepas de Mycobacterium tuberculosis sensíveis e multidroga-resisten.** [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

STROUD, J. C. et al. Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. **Structure**, v. 14, n. 1, p. 159–166, 2006.

TOMIYAMA, H.; MATSUDA, T.; TAKIGUCHI, M. Differentiation of Human CD8+ T Cells from a Memory to Memory/Effector Phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5538–5550, 2002.

TONACO, M. M. et al. Evaluation of profile and functionality of memory T cells in pulmonary tuberculosis. **Immunology Letters**, v. 192, n. September, p. 52–60, 2017.

URDAHL, K. B. Understanding and overcoming the barriers to T cell-mediated immunity against tuberculosis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 578–587, dez. 2014.

VEATCH, A. V.; KAUSHAL, D. Opening Pandora's Box: Mechanisms of Mycobacterium tuberculosis Resuscitation. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 145–157, fev. 2018.

VERVER, S. et al. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 12, p. 1430–1435, 2005.

VINCENT, A. T. et al. The mycobacterial cell envelope: A relict from the past or the result of recent evolution? **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–9, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis report.** Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris>>.

YANG, B. et al. Elevated expression of T-bet in mycobacterial antigen-specific CD4+ T cells

from patients with tuberculosis. **Cellular Immunology**, v. 298, n. 1–2, p. 1–8, 2015.

YONG WOO JUNG, R. L. R. et al. Differential Localization of Effector and Memory CD8 T Cell Subsets in Lymphoid Organs during Acute Viral Infection. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5315–5325, 2014.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: CÉLULAS T REGULADORAS: AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULATÓRIO NA ATIVIDADE MICROBICIDA FRENTE AO DESAFIO POR *Mycobacterium tuberculosis*

ENTIDADE EXECUTORA: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues – (27) 3335-7210

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem por objetivo determinar a influência de células da imunidade em resposta à infecção pela bactéria causadora da tuberculose (TB). Sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá deixar o estudo em qualquer momento. A sua decisão em não participar ou de se retirar do estudo depois do mesmo já ter iniciado não ocasionará nenhum problema no tratamento médico de sua doença ou de seus familiares em nosso hospital, hoje ou no futuro. Você deve tirar todas as dúvidas que possam surgir após você ler e ouvir as explicações deste termo de consentimento.

Justificativa do estudo

A tuberculose é uma doença séria que afeta os pulmões e pode afetar outras partes do seu corpo. Ela é uma doença muito comum no Brasil sendo causada por uma bactéria chamada *Mycobacterium tuberculosis*. Acredita-se que a susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*, seja resultante da presença de uma resposta imune ineficaz contra a bactéria. Apenas 10% das pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis* irão apresentar alguma forma da doença ao longo da vida, enquanto os 90% restantes dos indivíduos desenvolvem uma resposta imune suficiente para eliminar a bactéria ou pelo menos conter a infecção.

Se você (seu representante legal) concordar inicialmente em participar do estudo, você deverá:

1. Informar aos médicos sobre problemas de saúde no passado, ou remédios que esteja tomando no momento.

2. Fazer uma consulta geral que irá incluir entre outras coisas exame físico, peso, pressão arterial e frequência cardíaca.
 3. Fazer exame de sangue para HIV, mesmo que você já tenha feito em outro lugar.
 4. Fazer Raio-X dos pulmões para avaliar a extensão da sua tuberculose. Se você já fez um Raio-X de pulmão há menos de duas semanas não será necessário repetir.
 5. Fazer exame do escarro para confirmar se você está mesmo com tuberculose.
 6. Fazer exames para avaliar seu estado de saúde, ou se você possui outras doenças.
- Se após esses exames, não houver nada que impeça a participação, e se você (ou seu representante legal) ainda quiser participar voluntariamente do estudo, você deverá:
7. Ceder amostra de sangue (mais ou menos 15 ml).

Confidencialidade

Suas informações pessoais, os resultados dos seus exames e o seu número de registro de participação no estudo que será usado em lugar do seu nome são confidenciais. Somente você e as pessoas envolvidas no estudo (médicos, enfermeiras, a Comissão de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo) terão acesso a elas. Algumas de suas amostras laboratoriais (sangue e escarro) poderão ser usadas em outros estudos de Tuberculose. Neste caso sua privacidade também será mantida, conforme prevê a lei brasileira.

Custos

Você não terá despesas decorrentes de sua participação no estudo. Todos os medicamentos e os exames realizados serão gratuitos.

Consentimento

Confirmando ter conhecimento do conteúdo deste termo. A minha assinatura ou minha impressão digital abaixo indica que concordo em participar desta pesquisa e por isso dou meu consentimento.

Participante da pesquisa

A proposta deste estudo foi devidamente explicitada ao voluntário (seu representante legal), com plena convicção do objetivo, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo.

Investigador

Testemunha

Em caso de desconfortos ocasionados pelos procedimentos citados, dúvidas em relação a este documento ou durante o desenvolvimento do projeto, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo telefone (27) 3335-7210 ou e-mail: cep.ufes@hotmail.com.