



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T RESPONSIVOS
AOS LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

CARLOS AUGUSTO OLIVEIRA JUNIOR

Salvador – BA

2022

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T RESPONSIVOS
AOS LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

CARLOS AUGUSTO OLIVEIRA JUNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Queiroz Silva

Salvador – BA

2022

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

O48c Oliveira Junior, Carlos Augusto

Caracterização das subpopulações de linfócitos T responsivos aos lipídios da parede celular do *mycobacterium tuberculosis*/ Carlos Augusto Oliveira Junior. _ Salvador, 2022.

55 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Adriano Queiroz Silva

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Lipídios. 4. Linfócitos T. I. Título.

CDU 616-002.5

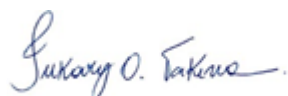
**“CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T RESPONSIVOS
AOS LÍPIDIOS DA PAREDE CELULAR DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS”.**

CARLOS AUGUSTO OLIVEIRA JUNIOR

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 13 de julho de 2022.

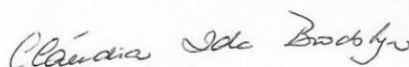
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Takemi Oliveira Takenami
Professora Adjunta
UNIVASF



Dra. Luana Leandro Gois
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) por meio do programa
PPSUS.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

AGRADECIMENTOS

Nunca pensei que chegaria a este momento! Carlos Oliveira, um menino curioso e amante de qualquer tipo de ciência, que desde pequeno sonhava em ser cientista e ter aqueles momentos de “Eureka!”. Sem dúvidas, sem essas pessoas que agradecerei logo abaixo, eu não teria realizado esse sonho.

Ao eterno Deus, por ter me ouvido todas as minhas preces nos momentos de aflição e ansiedade

À minha mãe e ao meu irmão, por todo apoio durante essa jornada durante toda a vida, ao qual, confiaram no meu potencial e me deram todo suporte para poder estar aqui.

Ao meu pai, que “lá de cima” está me protegendo e me guiando para os melhores caminhos.

À minha querida Vó Jaci, por todo amor e carinho. Como eu queria que a senhora estivesse aqui presente para ver de perto a alegria do seu neto.

À minha querida Carine Almeida, minha melhor amiga e incentivadora. Obrigado por sempre está comigo nesses 5 anos, me aconselhando e tornando essa jornada mais leve possível.

Aos meus amigos e familiares, por todos os momentos descontraídos e alegres vivenciados.

À família Almeida, por todo acolhimento e ter permitido fazer parte da família.

Ao meu orientador Dr. Adriano Queiroz, por acreditar em mim no último momento da graduação e confiar no meu potencial. Sou imensamente grato por todos os ensinamentos, conselhos e discussões científicas que sempre foram enriquecedoras.

Ao Dr. Thiago Marconi, por toda ajuda científica durante toda essa trajetória. Sou grato por toda disponibilidade, discussões e histórias legais a cada aquisição na plataforma da citometria.

À Dr. Sérgio Arruda e Dra. Iukary Takenami, por ter me dado a primeira oportunidade de fazer ciência logo no início da graduação.

Ao meu laboratório P0, ao meu Team HEOM. Como eu conseguiria sem vocês? Vocês são o melhor time do mundo. Obrigado por todos os conselhos, risadas, discussões, cafés com biscoitos zero lactose, momentos de alegria e aflições. Eu saio dessa casa com a sensação de missão cumprida. Espero ter deixado um pouquinho de mim em cada um. Ah! Não é um adeus, somente um “até logo!”.

Ao LASP, sem dúvidas foi minha segunda casa (literalmente). Agradeço imensamente a todos os colaboradores, por todo suporte nos bastidores essencial para que tudo aconteça da melhor forma possível.

À toda equipe do HEOM, por todos os momentos de trabalho com muita alegria e humanidade. Vocês são o melhor exemplo que o SUS é muito importante e salva vidas.

Por fim, a todos que venham a ler essa minha pequena, mas importante contribuição científica, lembrem que um artigo não te define. Confiem em si e nos seus valores. A caminhada na vida acadêmica é difícil, mas no final tudo é recompensado.

Como falei lá em cima,

Missão cumprida!

“A menor distância entre dois pontos é a ciência”

(Autor desconhecido)

OLIVEIRA JUNIOR, Carlos Augusto. **Caracterização das subpopulações de linfócitos T responsivos aos lipídios da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis***. 55 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A tuberculose (TB), doença infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é um grave problema de saúde pública. Estudos da resposta imune à infecção pelo Mtb, nas últimas décadas, têm sido baseados na resposta mediada pelos antígenos peptídicos micobacterianos. Evidências acumuladas têm sugerido o papel dos lipídios como componente essencial para a imunopatogênese da TB. No entanto, ainda são escassas as informações sobre as respostas de células T aos lipídios do Mtb em uma perspectiva populacional e com base nos indivíduos com TB ativa, infecção latente e naqueles não infectados. As informações obtidas nesse estudo podem ser úteis para a identificação de marcadores diagnósticos e no estudo de vacinas para TB. **OBJETIVOS:** Avaliar as respostas funcionais das subpopulações de células T responsivas aos lipídios do Mtb em pacientes com TB pulmonar, bem como em indivíduos saudáveis com infecção latente pelo Mtb ou não infectados. **METODOLOGIA:** Pacientes com diagnóstico de TB pulmonar, contatos domiciliares, infectados ou não pelo Mtb e indivíduos sem histórico de contato foram incluídos no estudo. Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram descongeladas e incubadas *in vitro* com o extrato lipídico total do Mtb por 18 horas e marcadas com anticorpos para detecção de marcadores de superfície celular (anti-CD4, CD8, CD45RO) e de proteínas intracelulares (anti-IFN γ , TNF- α , IL-10 e Granzima B) para análise por citometria de fluxo. Sobrenadantes de cultura foram utilizados para quantificar os níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-10. **RESULTADOS:** Entre janeiro de 2021 e janeiro de 2022, 73 indivíduos foram recrutados e incluídos para estudo. Destes, 13 indivíduos com TB ativa (TB), nove indivíduos com tuberculose latente (TBL), 12 indivíduos contatos domiciliares com IGRA negativo (CSC) e 12 indivíduos não contatos domiciliares (CSNC) foram elegíveis para análise. Observamos uma maior frequência global de linfócitos T CD8⁺, e principalmente, os linfócitos T CD8^{hi} em CMSP de indivíduos com TB ativa. Os lipídios induziram maior expressão de IFN- γ e TNF- α somente por linfócitos T CD4⁺ de contatos domiciliares não infectados. Curiosamente, somente linfócitos T CD8^{hi} de indivíduos com TB foram capazes de responder *in vitro* aos lipídios mediante produção de TNF- α , IL-10 e Granzima B. Os lipídios do Mtb não foram capazes de modular a produção de IFN- γ e IL-10 em sobrenadante de cultura na maioria dos grupos avaliados. Em contrapartida, foram capazes de induzir a produção TNF- α em todos os grupos. **CONCLUSÕES:** Os dados mostraram que a resposta dos linfócitos T ao extrato lipídico do Mtb não foi capaz de distinguir os grupos avaliados no estudo, após 18 horas de cultura. No entanto, os lipídios parecem ser bons indutores de IFN- γ e TNF- α por linfócitos T CD4⁺, bem como, na expressão de TNF- α , IL-10 e Granzima B por linfócitos T CD8^{hi} de indivíduos com TB. Por fim, os lipídios são bons indutores de citocinas por CMSP, e essa resposta pode ser explorada em estudos de avaliação da resposta imunopatológica da TB.

Palavras-chave: Tuberculose. *Mycobacterium tuberculosis*. Lipídios. Linfócitos T.

OLIVEIRA JUNIOR, Carlos Augusto. **Characterization of subpopulations of lipid-responsive T lymphocytes in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis***. 55 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Tuberculosis (TB), an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), is a serious public health problem. Studies of the immune response to Mtb infection in recent decades have been based on the response mediated by mycobacterial peptide antigens. Evidence has suggested the role of lipids as an essential component in the immunopathogenesis of tuberculosis. However, information on T cell responses to Mtb lipids from a population perspective and based on individuals with active TB, latent infection and those uninfected is still scarce. The information obtained in this study may be useful for the identification of diagnostic markers and in the study of TB vaccines. **OBJECTIVE:** To evaluate the functional responses of Mtb lipid-responsive T cell subpopulations in patients with pulmonary tuberculosis as well as in healthy individuals with latent Mtb infection or uninfected. **MATERIAL AND METHODS:** Patients with pulmonary TB, household contacts, whether Mtb infected or uninfected, and individuals without history of contact were enrolled in this study. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were thawed and incubated in vitro with Mtb total lipid extract for 18 hours and stained with antibodies to detect cell surface markers (anti-CD4, CD8, CD45RO) and intracellular proteins (anti-IFN- γ , TNF- α , IL-10 and Granzyme B) for analysis by flow cytometry. Culture supernatants were used to quantify the levels of IFN- γ , TNF- α and IL-10. **RESULTS:** Between January 2021 and January 2022, seventy-three participants were recruited and enrolled for this study. Of these, thirteen patients with active TB (TB), nine patients with latent TB (LTB), twelve IGRA-negative household contact individuals (CHC) and twelve non-household contact individuals (NCHC) were eligible for analysis. We observed a higher proportion of CD8⁺ T lymphocytes, and especially CD8^{hi} T lymphocytes in PBMC from individuals with active TB. Lipids induced higher expression of IFN- γ and TNF- α only by CD4⁺ T lymphocytes from uninfected household contacts. Interestingly, only CD8^{hi} T lymphocytes from TB individuals were able to respond in vitro to lipids by producing TNF- α , IL-10 and Granzyme B. Mtb lipids were not able to modulate IFN- γ and IL-10 production in culture supernatant in most groups evaluated. However, they were able to induce TNF- α production in all groups. **CONCLUSION:** The data showed that the response of T lymphocytes to the lipid extract of Mtb was not able to distinguish the groups evaluated in the study, after 18 hours of culture. However, lipids seem to be good inducers of IFN- γ and TNF- α by CD4⁺ T lymphocytes, as well as the expression of TNF- α , IL-10 and Granzyme B by CD8^{hi} T lymphocytes from individuals with TB. Finally, lipids are good inducers of cytokines by PBMC, and this response can be explored in studies evaluating the immunopathological response of TB.

Keywords: Tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*. Lipids. T lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Taxas estimadas de incidência da tuberculose no mundo em 2020.	19
Figura 2	Representação esquemática da parede celular do <i>M. tuberculosis</i>	23
Figura 3	Representação esquemática da apresentação de antígenos lipídicos para linfócitos T específicos a CD1.	26
Figura 4	Fluxograma de recrutamento do estudo	30
Figura 5	Estratégia de seleção das subpopulações de linfócitos T	34
Figura 6	Fluxograma de recrutamento dos indivíduos elegíveis.	35
Figura 7	Análise da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ totais e memória após cultura de CMSP por 18 horas sem estímulo.	37
Figura 8	Análise da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ totais e memória após cultura de CMSP por 18 horas sem estímulo.	38
Figura 9	Análise da frequência de linfócitos T CD8 ^{hi} totais e memória após cultura de CMSP por 18 horas sem estímulo.	40
Figura 10	Análise da frequência de linfócitos T duplo negativos totais e memória após cultura de CMSP por 18 horas sem estímulo.	41
Figura 11	Análise da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e Granzima B por linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ^{hi} e DN após cultura de CMSP não estimuladas e estimuladas por 18 horas com extrato lipídico da parede celular do <i>M. tuberculosis</i> .	43
Figura 12	Análise da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e Granzima B por linfócitos T CD8 ^{hi} de memória após cultura de CMSP não estimuladas e estimuladas por 18 horas com extrato lipídico da parede celular do <i>M. tuberculosis</i> .	44
Figura 13	Avaliação dos níveis de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP estimuladas por 18 horas com extrato lipídico do <i>M. tuberculosis</i> .	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caraterísticas clínicas e demográficas dos indivíduos do estudo.	36
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac ₂ SGL	Sulfoglicolípido diacilado
AM	Ácido Micólico
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFP-10	<i>10 kDa culture filtrate antigen</i>
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
COVID	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CSC	Controle Saudável Contato
CSNC	Controle Saudável Não Contato
CXCL2	<i>Chemokine ligand 2</i>
DAT	Diaciltrealose
DMSO	Dimetilsufóxido
DN	Duplo Negativo
DosR	<i>Dormancy survival regulator</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESAT-6	<i>6 kDa Early secretory antigen target</i>
ESX-1	<i>ESAT-6 secretion system 1</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GroMM	Monomicolato de Glicerol
HEOM	Hospital Especializado Octávio Mangabeira
HIV	<i>Human Immunodeficiency Vírus</i>
IFN- γ	<i>Interferon Gamma</i>
IGRA	<i>Interferon-gamma release assay</i>
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
ILTb	Infecção Latente da Tuberculose

LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
ManLAM	Liporabinomanano manosilado
MCE1	<i>Mammalian cell entry 1</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis Complex</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões Moleculares associados a patógenos
PAT	Poliaciltrealose
PDIM	Dimicocerato de fitiocerol
PIM	Fosfatidilinositol manosídeo
PPD	Purified protein derivative
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PT	Prova tuberculínica
RD1	<i>Region of difference-1</i>
RPM	rotações por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SL	Sulfolipídio
TB	Tuberculose ativa
TBL	Tuberculose Latente
TCR	Receptor de Células T
TDM	Dimicolato de trealose
TH1	<i>T helper 1</i>
TH2	<i>T helper 2</i>
TLR	Receptores do tipo <i>toll-like</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.2 TRANSMISSÃO E RESPOSTA IMUNE.....	20
2.3 RESPOSTA IMUNE CELULAR AOS ANTÍGENOS PEPTÍDICOS DO <i>M. TUBERCULOSIS</i>	21
2.4 LIPÍDIOS DO MTB	23
2.4.1 Parede celular do Mtb	23
2.4.2 Lipídios envolvidos na imunopatogênese da TB	24
2.4.3 Papel dos lipídios na resposta imune da TB.....	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 LOCAL DE ESTUDO.....	29
4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	29
4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	30
4.4 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS AVALIADOS.....	31
4.4.1 Questionário	31
4.4.2 Coleta de sangue	31
4.4.3 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico.....	32
4.4.4 Estímulo <i>in vitro</i> das CMSP com os lipídios do <i>M. Tuberculosis</i>	32
4.4.5 Análise das subpopulações de linfócitos por Citometria de Fluxo.....	32
4.4.6 Análise das citocinas do sobrenadante por ELISA.....	33

4.5 PROPOSTA DE ANÁLISE	33
5 RESULTADOS	35
5.1 FLUXOGRAMA DE RECRUTAMENTO E AVALIAÇÃO DA CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS VOLUNTÁRIOS	35
5.2 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ NÃO ESTIMULADOS	36
5.3 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ NÃO ESTIMULADOS	37
5.4 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T DUPLO-NEGATIVOS (CD3 ⁺ CD8 ⁻ CD4 ⁻) NÃO ESTIMULADOS	40
5.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41
5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS POR LIPÍDIOS EM CULTURA DE CMSP	43
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), doença infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é um grave problema de saúde pública. Em 2020, estima-se que 10 milhões de pessoas adoeceram e cerca de 1,5 milhões de óbitos foram notificados (OMS, 2021). O Brasil está entre os 30 países com maior incidência de TB no mundo, sendo o 19º país em número de casos da doença (OMS, 2021). Na Bahia, segundo o sistema de informação de agravos de notificação (SINAN), foram registrados 3.936 casos confirmados de TB. Dentre esses, Salvador notificou quase 1,4 mil casos (35%) (BRASIL, 2021).

Atualmente, os estudos da resposta imune à infecção pelo Mtb têm sido focados na resposta mediada pelos antígenos peptídicos micobacterianos apresentados aos linfócitos T via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Dentre esses, proteínas do Mtb, como ESAT-6 (do inglês, *ESAT-6 secretion system 1*), CFP-10 (do inglês, *10 kDa culture filtrate antigen*), Ag85, DosR, TB10.4 são amplamente estudadas, e utilizadas para avaliar a resposta de linfócitos T ao *M. tuberculosis* (LINDESTAM ARLEHAMN et al., 2014) e no estudo de candidatos vacinais para TB (YUK; JO, 2014; QIAN et al., 2020). Estudos mostraram uma evidente resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de citocinas após estímulo com ESAT-6, CFP-10 e Ag85 do Mtb em CMSP de pacientes com TB ativa (CACCAMO et al., 2009, 2010; SUTHERLAND et al., 2009). Além disso, esses antígenos induziam perfis fenotípicos e funcionais distintos dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ entre TB e infecção latente (HARARI et al., 2011; ROZOT et al., 2013). Apesar da resposta imune induzida pelos antígenos peptídicos ser importante, a resposta imune ao Mtb é iniciada a partir da interação das células imunes com o parede celular do bacilo, constituída principalmente por carboidratos e lipídios.

O *M. tuberculosis* possui uma parede celular rica em lipídios e parte do seu genoma é dedicado a produção de enzimas relacionadas com a biossíntese e degradação destas moléculas (COLE et al., 1998). Mais de 5.000 espécies lipídicas já foram descritas no Mtb (KARAKOUSIS; BISHAI; DORMAN, 2004; LAYRE et al., 2011), muitas delas têm sido associadas à atividade de macrófagos, produção de citocinas e formação do granuloma. De fato, macrófagos estimulados por dimicolato de trealose (TDM) produziam óxido nítrico, TNF- α e CXCL2 (ISHIKAWA et al., 2009). Além disso, a regulação desses lipídios na parede celular do Mtb parece contribuir na persistência do bacilo na infecção, através da inibição da produção de IL-12 por células dendríticas e apoptose em macrófagos (NIGOU et al., 2002), inibição da biogênese fagolisossomal e fagocitose em macrófagos (GOREN et al., 1976; PABST et al.,

1988). Embora reveladores, ainda são escarças as informações sobre as respostas de células T aos lipídios do Mtb. Além disso, os estudos acima ou foram baseados em cepas de Mtb geneticamente modificadas ou não avaliaram as respostas imunes induzidas pelos lipídios do Mtb em uma perspectiva populacional e com base nos indivíduos com TB ativa, com infecção latente da tuberculose (ILTb) e naqueles não infectados. Uma abordagem baseada nessas populações aumentaria a nossa compreensão sobre o papel dos lipídios do Mtb na imunopatologia da TB.

A avaliação das respostas induzidas pelos lipídios do Mtb tem mostrado o papel dessas moléculas em modular as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro. Petrilli e colaboradores (2020) mostraram que mudanças na composição de lipídios na parede celular do Mtb são responsáveis por induzir ou modular negativamente a resposta inflamatória em macrófagos murinos. Em um modelo de co-cultura, macrófagos pré-estimulados com os lipídios apolares também estimularam o aumento de células T autólogas duplo negativas ($CD3^+ CD4^- CD8^-$) em CMSP de indivíduos saudáveis, e o aumento da frequência de células T $CD8^+$ produtoras de TNF- α em células de indivíduos com tuberculose pulmonar. A produção de TNF- α por células T $CD8^+$ não foi observada nos indivíduos saudáveis (PETRILLI et al., 2020).

Em um outro estudo, células T específicas para ácidos micólicos foram detectadas em pacientes com TB e não em controle saudáveis. Estas células exibiam predominantemente fenótipo $CD4^+$ ou $CD8^+$, e produziam citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN- γ (MONTAMAT-SICOTTE et al., 2011). Além disso, o sulfoglicolipídio diacilado (Ac_2SGL) induziu uma maior produção de IFN- γ em células $CD8^+$ de pacientes com TB e indivíduos com prova tuberculínica (PT) positivo, mas não em TT negativo (GILLERON et al., 2004).

Nesse sentido, o presente estudo busca caracterizar e comparar a resposta induzida por lipídios do Mtb em células de indivíduos com TB pulmonar, saudáveis com infecção latente e saudáveis sem infecção. As informações obtidas nesse estudo podem ser úteis para a identificação de marcadores diagnósticos e no estudo de vacinas para TB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose continua sendo uma das principais causas de óbitos por infecções no mundo, matando, por dia, cerca de 4000 pessoas. Estima-se que cerca de 25% da população mundial esteja infectada pelo Mtb e em risco de progressão para doença ativa. Em 2020, cerca de 10 milhões de pessoas desenvolveram a doença ativa e 1,5 milhões de óbitos foram notificados no mundo. Além disso, o número de casos de TB resistente à medicamentos continua a aumentar, sendo a doença que mais mata por resistência antimicrobiana (OMS, 2021).

O Brasil continua entre os países com maiores taxas de incidência da TB no mundo (45/100 mil habitantes por ano) (Figura 1). Em 2020, cerca de 96 mil pessoas desenvolveram a doença no país e quase 8 mil óbitos foram notificados (OMS, 2021). A Bahia é segundo estado do nordeste com mais casos de TB. Em 2020, no estado da Bahia foram registrados 3.936 casos confirmados de TB. Dentre esses, Salvador notificou quase 1,4 mil casos (35%) (BRASIL, 2021).

A pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) pode agravar esses números. Estima-se que a interrupção do acesso a serviços de diagnóstico e tratamento tenham causado um aumento de cerca de 100 mil óbitos por TB entre 2019 e 2020 (OMS, 2021). Além disso, cerca de 6,3 milhões de casos e 1,4 milhões de óbitos adicionais podem ocorrer até 2025, implicando em atraso nas metas para fim da TB estabelecidas pela OMS (CILLONI et al., 2020).

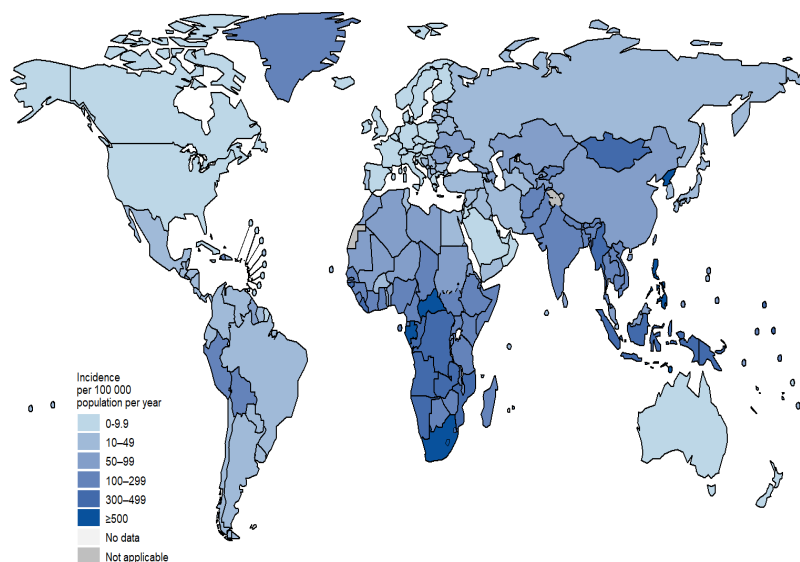


Figura 1 - Taxas estimadas de incidência da tuberculose no mundo em 2020.
Fonte: (OMS, 2021.)

2.2 TRANSMISSÃO E RESPOSTA IMUNE

A transmissão da *M. tuberculosis* ocorre após a inalação de partículas contaminadas, que são expelidas por indivíduos bacilíferos através da tosse, espirro ou fala. A quantidade de bacilos expelidos, tempo de exposição, comorbidades e o estado imunológico do indivíduo exposto são fatores que afetam o sucesso da transmissão (MATHEMA et al., 2017; PAI et al., 2016).

Após a inalação, o Mtb segue até o trato respiratório inferior. Nos alvéolos, a primeira linha de defesa é composta por diversas células fagocíticas, como neutrófilos, células dendríticas e, principalmente, macrófagos alveolares residentes. No primeiro contato, estas células fagocitam os bacilos. Esse mecanismo é mediado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como os receptores do tipo *toll-like* (TLRs), principalmente o TLR-2, TLR-4 e TLR-9 (MAYER-BARBER; BARBER, 2015). O reconhecimento promove a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 12 (IL-12), fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) por estas células (ZUÑIGA et al., 2012).

Após, a fagocitose, os bacilos contidos no fagolisossoma são processados e seus antígenos apresentados via complexo principal de histocompatibilidade da classe I ou II (MHC-I ou MHC-II) para linfócitos T CD8⁺ ou CD4⁺ *naïve* nos linfonodos, respectivamente. A produção de IL-12 por macrófagos induz a diferenciação ao fenótipo T *helper* 1 (Th1) nos linfócitos T CD4⁺, que produzem IFN- γ . Esse mecanismo é essencial para o controle da infecção pelo Mtb, pois produção de IFN- γ ativa a capacidade microbicida dos macrófagos (MOUTINHO, 2011).

No entanto, os macrófagos também podem ser essenciais para persistência do patógeno. Quando infectados, essas células permitem o acesso do Mtb ao interstício pulmonar após o processo de transmigração, ao qual resulta na formação do granuloma (PAI et al., 2016). Essa estrutura tem por objetivo conter a disseminação dos bacilos através de um agregado organizado de células imunes composto por macrófagos, monócitos, células dendríticas, fibroblastos, linfócitos B e T (LUGO-VILLARINO et al., 2013) e, a presença dessa estrutura é característica da infecção latente pelo Mtb. No entanto, evidências demonstraram que as micobactérias utilizam a formação do granuloma para persistência da infecção e, conseqüentemente, proliferação e disseminação do bacilo no hospedeiro (VOLKMAN et al., 2004; DAVIS; RAMAKRISHNAN, 2009).

Devido à alguns mecanismos ainda não completamente elucidados, o granuloma pode se romper e acarretar a disseminação do bacilo ocasionando o desenvolvimento da doença ativa.

Fatores associados ao hospedeiro como coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e consequente diminuição da contagem de linfócitos T CD4⁺, importantes na manutenção do granuloma, estão envolvidos no rompimento dessa estrutura (BELL; NOURSADEGHI, 2018). Além dos linfócitos T CD4⁺, o papel dos linfócitos T CD8⁺ durante a infecção pelo *Mtb* tem sido estudado. Essas células possuem capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) e de atividade citolítica via produção de grânulos citotóxicos, como perforina, granzimas e granulinas. Em camundongos, a depleção dessas células resultou no aumento da carga bacteriana (VAN PINXTEREN et al., 2000). Além disso, essa depleção resultou na diminuição significativa na imunidade induzida pela vacina Bacille Calmette-Guérin (BCG) em macacos rhesus (CHEN et al., 2009). Apesar de evidências concisas do papel dos linfócitos T CD8⁺ na TB em modelos animais, é difícil determinar a contribuição direta dessas células na proteção contra TB em humanos.

2.3 RESPOSTA IMUNE CELULAR AOS ANTÍGENOS PEPTÍDICOS DO *M. TUBERCULOSIS*

Os estudos que avaliam a resposta imune ao *Mtb* têm sido focados na utilização de antígenos peptídicos micobacterianos. A conclusão do sequenciamento completo do genoma do *M. tuberculosis* em 1998 (COLE et al., 1998) tornou possível a identificação de antígenos peptídicos específicos para avaliação da resposta imunológica durante a TB, desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas.

ESAT-6 e o CFP-10 são exemplos dos antígenos proteicos clássicos avaliados nos estudos. Estes antígenos são codificados pela região de diferença 1 (RD1) do genoma micobacteriano, específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e que está ausente no genoma do *M. bovis* BCG (MAHAIRAS et al., 1996). A potente indução da produção de IFN- γ por células T é uma das características principais desses antígenos, sendo utilizada na identificação da sensibilização pelo *M. tuberculosis* através dos ensaios de liberação de interferon-gama (IGRA).

Esses antígenos podem induzir assinaturas funcionais distintas em células T entre indivíduos com TB ativa, ILTB e não infectados. Marín e colaboradores (2013) avaliaram a resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺ em CMSP humano após estímulo *in vitro* com três antígenos diferentes (CFP-10, PPD e antígeno bruto do *Mtb*). A frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou TNF- α foi maior em indivíduos com TB ativa em comparação com indivíduos saudáveis não infectados após estímulo de CMSP com PPD. No entanto, essa diferença não foi

observada quando as células foram estimuladas com CFP-10 e antígeno bruto do Mtb (MARÍN et al., 2013). Além disso, CMSP de pacientes com TB ativa também mostraram maior frequência de CD8⁺ totais e policitotóxicas (produtoras de Granzima A e B) após estímulo com ESAT-6 e CFP-10 (ROZOT et al., 2013).

Além desses antígenos peptídicos clássicos, diversos outros antígenos têm sido avaliados. Meier e colaboradores (2018) identificaram que mais 300 antígenos peptídicos do *M. tuberculosis* foram recentemente testados para avaliar a resposta imune na TB. Dentre esses, antígenos do complexo Ag85, antígenos associados à latência e associados à reativação do Mtb foram os mais testados (MEIER et al., 2018). Esses antígenos foram explorados com o objetivo de identificar resposta celulares específicas ao Mtb nos diferentes estágios da infecção (LINDESTAM ARLEHAMN et al., 2014).

O complexo Ag85 compreende uma família de antígenos (Ag85A, Ag85B, Ag85C) secretados pelo Mtb essenciais para sua patogenicidade (KARBALAEI ZADEH BABAKI; SOLEIMANPOUR; REZAEI, 2017). Esses antígenos induziram proliferação de linfócitos T e produção de IFN- γ em pacientes com prova tuberculínica positiva (LAUNOIS et al., 1994). Respostas de linfócitos T CD8⁺ específicos de Ag85 também foram observadas em indivíduos saudáveis vacinados com BCG após um longo tempo da vacinação (SMITH et al., 2000).

Em uma análise ampla desses antígenos, Rakshit e colaboradores (2017) avaliaram perfis fenotípicos e funcionais de linfócitos T CD4⁺ específicos dos antígenos *DosR*, Ag85A/B, TB10.4, ESAT-6/CFP-10 e PPD entre indivíduos com TB pulmonar, TB extrapulmonar e com ILTB. Foi observada uma maior proporção de linfócitos T CD4⁺ de produtoras de citocinas em CMSP de pacientes com TB extrapulmonar e ILTB somente quando estimuladas com antígenos *DosR*. Para os demais antígenos, essa diferença só foi observada na quantificação de IFN- γ em culturas de sangue total. Além disso, uma maior proporção de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ de memória foi observada em indivíduos com infecção latente em comparação com doença ativa somente quando estimuladas pelos antígenos do complexo *DosR* (RAKSHIT et al., 2017). Anteriormente, a produção de IFN- γ após estímulo *in vitro* de CMSP com antígenos de latência foi também maior em indivíduos com prova tuberculínica positivo do que em pacientes com TB ativa (LEYTEN et al., 2006). Curiosamente, antígenos associados à reativação estimularam somente células isoladas de comunicantes domiciliares a produzirem IFN- γ em comparação com pacientes com TB ativa (CHEGOU et al., 2012).

Apesar de interessante, esses dados exploram somente uma classe de antígenos do Mtb na resposta de células T. No entanto, a interação bactéria-hospedeiro compreende outras classes de antígenos como lipídios e carboidratos.

2.4 LIPÍDIOS DO MTB

2.4.1 Parede celular do Mtb

A composição da parede celular do *M. tuberculosis* é uma característica única entre bactérias (Figura 2). Ela pode ser caracterizada em duas camadas: inferior e superior. A camada inferior é formada por um complexo de ligação de moléculas chamado micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP), que forma o núcleo da parede celular. A camada superior é composta por lipídios livres como dimicocerato de fitiocerol (PDIM), dimicolato de trealose (TDM), sulfolipídios (SL), lipoglicanos, ácidos micólicos livres (BRENNAN, 2003).

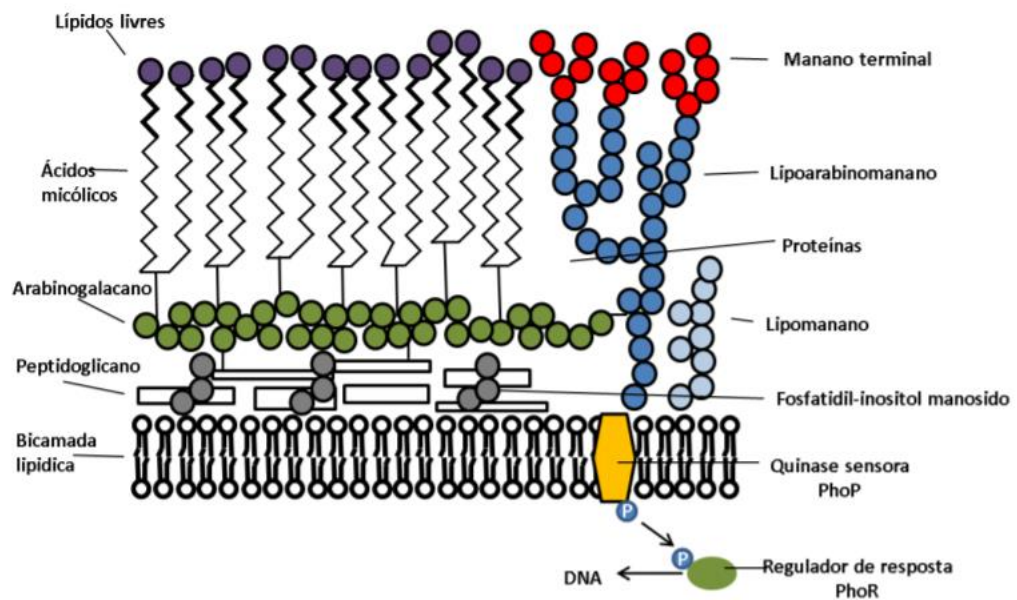


Figura 2 - Representação esquemática da parede celular do *M. tuberculosis*.
Fonte: (PARK; BENDELAC, 2000)

Esses lipídios compõem cerca de 40% do peso seco do Mtb. Além disso, parte do genoma do Mtb é dedicado a produção de enzimas envolvidas na biossíntese e degradação dessas moléculas. Estima-se que são encontradas mais de 5000 espécies lipídicas no Mtb, ao qual a localização destas moléculas na parede celular permite o reconhecimento por células imunes (KARAKOUSIS; BISHAI; DORMAN, 2004; LAYRE et al., 2011).

2.4.2 Lipídios envolvidos na imunopatogênese da TB

Durante a fase inicial da resposta imune contra o *M. tuberculosis*, as células fagocíticas residentes no pulmão – macrófagos e células dendríticas – reconhecem os lipídios da parede celular do Mtb através dos receptores TLR-2 e TLR-4. Os lipídios, como o dimicolato de trealose, os sulfolipídios, ácidos micólicos, lipoglicanos e o dimicocerato de fitiocerol são exemplos de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) reconhecidos durante a resposta imune inicial. O papel desses lipídios na imunopatogênese da TB tem sido avaliado em estudos com cepas mutantes do Mtb e/ou em modelos murinos.

O TDM é um glicolipídio presente em cepas virulentas do Mtb, sendo anteriormente denominado fator corda. Esta molécula é descrita como fator de virulência durante a infecção pelo Mtb. Os primeiros estudos com o TDM mostraram que a injeção parenteral foi tóxica (BLOCH, 1950) e induziu uma resposta granulomatosa em pulmões de camundongos (BEKIERKUNST, 1968). De fato, Ishikawa e colaboradores (2009) mostraram que a ativação da lectina tipo C (Mincle) por TDM estimulou macrófagos a produzirem óxido nítrico, TNF- α e CXCL2, que culminou na formação de granuloma (ISHIKAWA et al., 2009). Além disso, metaloproteinases de matriz (MMPs), envolvidas na formação de granulomas, foram reguladas positivamente após estímulo de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com microesferas revestidas com TDM (QUIDING-JÄRBRINK; SMITH; BANCROFT, 2001).

Além de ser importante para a formação do granuloma, o TDM é uma fonte essencial para síntese de ácidos micólicos (AM), a partir da sua hidrólise (YANG et al., 2014). Os AM são os lipídios mais abundantes da parede celular do Mtb, no qual se apresentam em três classes distintas (alfa-AM, keto-AM e methoxy-AM) (BARRY III et al., 1998). A quantidade dessas classes na parede celular parece influenciar na regulação da persistência do Mtb durante a infecção. Estudos anteriores mostraram que a diferença relativa na quantidade das classes keto e methoxy influenciam o crescimento do Mtb em macrófagos (YUAN et al., 1998) e a ausência destas moléculas está relacionada com atenuação bacteriana intracelular (DUBNAU et al., 2000). De fato, o Mtb possui um transportador putativo microbiano - *Mce1* - que possivelmente está envolvido na importação de ácidos graxos na parede celular. Cepas com interrupção no operon *Mce1* acumulam mais AM na parede celular do que cepas selvagens (CANTRELL et al., 2013; FORRELLAD et al., 2014). Além disso, a cepa mutante tornou-se hipervirulenta, sendo incapaz de induzir uma resposta pro-inflamatória e a formação de granuloma organizado em camundongos (SHIMONO et al., 2003).

Os lipoglicanos ligados a parede celular, como o lipomanano (LM), Lipoarabinomanano (LAM), Lipoarabinomanano manosilado (ManLAM) e o fosfatidilinositol manosídeo (PIM) são outros lipídios que desempenham papel essencial na imunopatogênese da TB. Essas moléculas induzem respostas imune distintas durante a infecção pelo Mtb. A LM, mas não PIM, induz a produção de IL-12 e apoptose em macrófagos (DAO et al., 2004). No entanto, LAM inibe a produção de IL-12 por células dendríticas e a apoptose de macrófagos contribuindo para sobrevivência do bacilo (NIGOU et al., 2002). Além disso, LM é um forte indutor da resposta inflamatória, a partir da produção de citocinas como TNF- α e IL-12 e a expressão de moléculas co-estimulatórias (QUESNIAUX et al., 2004).

O *M. tuberculosis* utiliza a via da β -oxidação para sintetizar lipídios em resposta as condições de estresse durante a infecção (MENDUM et al., 2015). Sulfolipídios (SL), dimicocerato de fitiocerol (PDIM), diaciltrealose (DAT) e poliaciltrealose (PAT) são produtos originados desta via metabólica. Os SL constituem uma das classes de lipídios mais importantes na parede celular do *M. tuberculosis*. Estas moléculas são encontradas somente em algumas cepas patogênicas do Mtb, possibilitando ser um importante alvo no estudo de biomarcadores da TB. O papel do sulfolipídio-1 (SL-1) – principal componente da classe - e seu precursor, o sulfolipídio diacilado (Ac₂SGL) tem sido relacionado com uma resposta imune tardia. A avaliação de cepas mutantes para genes envolvidos no transporte dessas moléculas demonstrou que o Mtb se multiplica independente da produção de SL-1 (CONVERSE et al., 2003) e acumula Ac₂SGL na parede celular com a interrupção do gene *mmpL8* (DOMENECH et al., 2004). No entanto, seu papel na imunopatogênese da TB é controverso. Estudos anteriores mostraram o SL-1 inibe a formação do fagolisossomos em macrófagos peritoneais de camundongos e, reduz a fagocitose e a produção de IL-1 em macrófagos (GOREN et al., 1976; PABST et al., 1988).

O PDIM também tem sido relacionado com redução da atividade microbicida dos macrófagos e na regulação da resposta imune. Astarie e colaboradores (2009) mostraram que PDIM interfere na fagocitose e bloqueia a acidificação do fagolisossomos, contribuindo com a persistência do bacilo (ASTARIE-DEQUEKER et al., 2009). Além disso, o Mtb mutante com deficiência na produção de PDIM, teve menor taxa de replicação e não foi capaz de formar granuloma (GOREN; BROKL; SCHAEFER, 1974).

2.4.3 Papel dos lipídios na resposta imune da TB

Atualmente, os estudos da resposta imune a infecção pelo Mtb em humanos tem sido focado na resposta mediada pelos antígenos peptídicos micobacterianos apresentados aos linfócitos T via moléculas do MHC (JAMES; SESHADRI, 2020). Entretanto, as células T também podem reconhecer antígenos lipídios (Figura 3), à medida que formam complexos estáveis com moléculas apresentadoras pertencentes a família de proteínas CD1 (DE LIBERO; MORI, 2014; ROSAT et al., 1999). As 5 isoformas de CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e) são classificadas por diferença estrutural, e sua distribuição celular e tecidual. Os lipídios do Mtb são apresentados pelas moléculas do grupo 1 (CD1a, CD1b e CD1c), incluindo os ácidos micólicos, lipoglicanos, sulfolipídios (DE LIBERO; MORI, 2005, 2014; JAMES; SESHADRI, 2020).

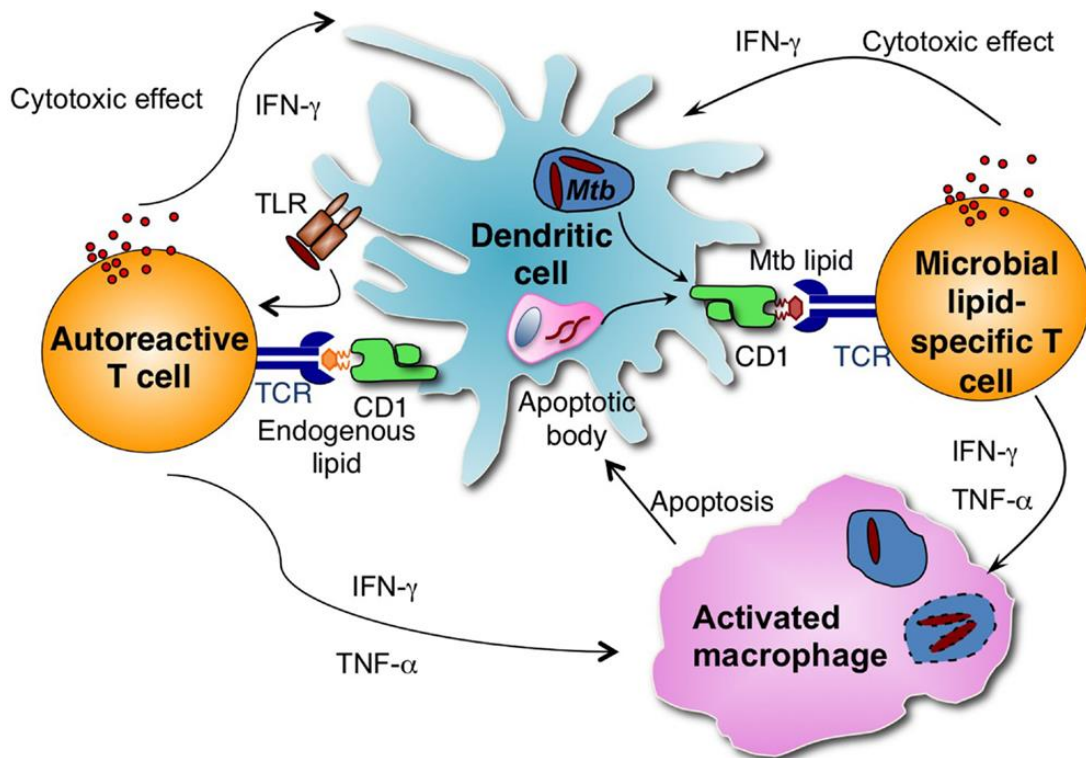


Figura 3 - Representação esquemática da apresentação de antígenos lipídicos para linfócitos T específicos a CD1.

Fonte: (SIDDIQUI; VISVABHARATHY; WANG, 2015)

Os primeiros lipídios identificados capazes de estimular células T foram os ácidos micólicos (AM). Estudos anteriores demonstraram que estes lipídios podem ter um papel importante na resposta de células T em indivíduos com TB. Células T específicas para AM foram detectadas em pacientes com TB e não em controle saudáveis. Estas células exibem

predominantemente fenótipo CD4⁺ ou CD8⁺, e produziam citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN- γ (MONTAMAT-SICOTTE et al., 2011). Os AM ainda podem ser cruciais para antigenicidade de outros antígenos lipídicos, como o monomicolato de glicerol (GroMM). Layre e colaboradores (2009) observaram que a resposta induzida por GroMM em células T é dependente da ligação de ácidos micólicos de cadeia longa, sugerindo que está ligação ajuda na formação de um complexo mais estável na apresentação antigênica desse lipídio (LAYRE et al., 2009).

Os AM também estão ligados a outros lipídios, como o dimicolato de trealose. O TDM é um glicolipídio presente em cepas virulentas do Mtb. Esta molécula também é descrita como fator de virulência durante a infecção pelo Mtb, sendo envolvida em diversos efeitos imunomoduladores como atividade quimiotática de células imunes, ativação de macrófagos que culmina em resistência a outros patógenos intracelulares, inibição da formação do fagolisossomos etc (KARAKOUSIS; BISHAI; DORMAN, 2004). No entanto, os efeitos gerados pelo TDM na resposta imune durante a infecção pelo Mtb em humanos ainda precisam ser elucidados.

Os sulfolipídios (SL) constitui uma das classes de lipídios mais abundante na parede celular do M. tuberculosis. Em humanos, o Ac₂SGL induziu uma maior produção de IFN- γ em células CD8⁺ de pacientes com TB e indivíduos com TT positivo, mas não TT negativo (GILLERON et al., 2004). O liporabinomanana (LAM), lipoglicano ligado a parede celular, também induzem a produção de IFN- γ em 65% dos indivíduos com TT positivo avaliados. Enquanto, somente 36% dos indivíduos TT positivos responderam ao Ac₂SGL (BUSCH et al., 2016). O LAM se mostrou ainda capaz de estimular maior frequência de células T policitotóxicas (produtoras de granzima B, perforina e granulinas) em CMSP de indivíduos TT positivo, e não de indivíduos curados da TB (BUSCH et al., 2016). Estes dados sugerem um importante papel destes lipídios durante a infecção pelo Mtb.

A avaliação da resposta imune induzida pelo extrato lipídico total do Mtb tem sido estudada. Petrilli e colaboradores (2020) identificaram que o extrato lipídico do Mtb foi capaz de estimular somente a proliferação de células T duplo negativas (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻) em indivíduos saudáveis e o aumento da frequência de células T CD8⁺ produtoras de TNF- α em indivíduos com tuberculose pulmonar (PETRILLI et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas funcionais das subpopulações de células T responsivas aos lipídios do Mtb em pacientes com tuberculose pulmonar, comparados com indivíduos saudáveis com infecção latente pelo Mtb ou não infectados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar fenotipicamente as subpopulações de células T CD4⁺, CD8⁺ e CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ DN (duplo-negativas), em células mononucleares do sangue periférico na população de estudo;
- II. Avaliar a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e Granzima B por células T CD8⁺ após estímulo com lipídios do Mtb nos grupos de estudo;
- III. Avaliar a produção de IL-10, TNF- α e IFN- γ por células T CD4⁺ e DN após estímulo com lipídios do Mtb nos grupos de estudo;
- IV. Avaliar a produção de IL-10, TNF- α , IFN- γ e Granzima B em sobrenadante de cultura de CMSP após estímulo com lipídios do Mtb;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi conduzido no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM) reconhecido como centro de referência para doenças respiratórias, localizado no bairro Pau Miúdo em Salvador, Bahia. O hospital pertence ao distrito sanitário da Liberdade, rede pública de saúde do Estado da Bahia. As análises laboratoriais foram realizadas no Instituto Gonçalo Moniz, unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do estado da Bahia, localizado no distrito sanitário de Brotas em Salvador - BA.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os participantes do estudo pertenciam a quatro grupos (Figura 4): Grupo 1 (TB), indivíduos com TB pulmonar confirmados (suspeita clínica da TB associado com resultado positivo no teste molecular GeneXpert MTB/RIF (Cepheid); e/ou resultado positivo na pesquisa direta do bacilo álcool ácido resistente (BAAR) no escarro, e/ou resultado positivo na cultura microbiológica do escarro; Grupo 2 (TBL), indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis*, confirmados pelo resultado positivo no Ensaio de Liberação de IFN- γ (do inglês *Interferon-gamma release assay* – IGRA) através do kit comercial QuantiFERON® TB Gold-Plus in Tube e, sem sinais clínicos de TB pulmonar; Grupo 3 (CSC), indivíduos saudáveis não infectados pelo *M. tuberculosis*, confirmados pelo resultado negativo no IGRA; Grupo 4 (CSNC), indivíduos saudáveis sem histórico de contato domiciliar com pacientes com TB pulmonar. Os indivíduos do grupo 2 e 3 foram identificados entre os contatos domiciliares dos pacientes com TB pulmonar. Foram considerados contatos domiciliares, todos aqueles que convivem no mesmo domicílio, ou que relatam, 100 horas de contato com paciente bacilífero. São critérios de não-inclusão para o estudo: indivíduos com evidência de TB extrapulmonar; indivíduos em uso de corticosteroides; co-infectados com HIV; menores de 18 anos ou maiores de 65 anos; e com resultado indeterminado no IGRA.

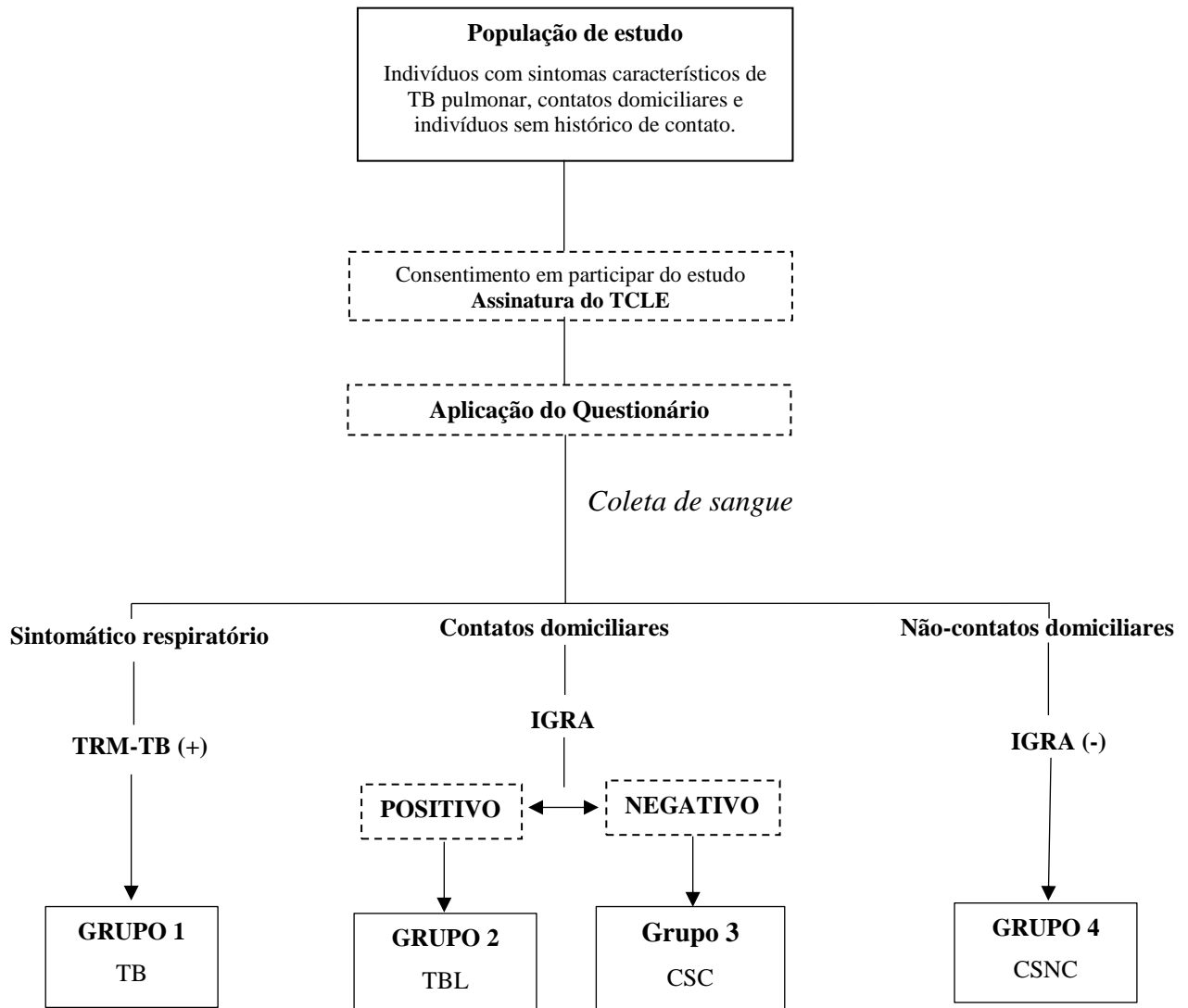


Figura 4 - Fluxograma de recrutamento do estudo. TB: tuberculose; TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido; TRM-TB: Teste Rápido Molecular para Tuberculose (Positivo); IGRA: ensaio de liberação de interferon gama (Negativo); ILTB: infecção tuberculosa latente; CSC: Controle Saudável Contato; CSNC: Controle Saudável Não-contato.

Fonte: Autoria própria

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo faz parte do projeto intitulado “Explorando as respostas mediadas por lipídios para o desenvolvimento de uma nova ferramenta diagnóstica para Tuberculose”. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM) – FIOCRUZ, conforme o CAAE N° 76009417.9.0000.0040. Seguindo as normas básicas do CEP, resolução 466/12, todos os participantes do estudo foram esclarecidos verbalmente e por escrito

sobre o objetivo do trabalho, os procedimentos que serão realizados e forma de contato com coordenador do estudo.

Todos os participantes atestaram a sua concordância com o estudo através da leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os termos assinados estão sob a guarda do coordenador da pesquisa, armazenados na instituição onde estão sendo feitas as análises. A participação no estudo é voluntária e confidencial. Cada indivíduo foi identificado com um código, que foi utilizado para assegurar a confidencialidade durante o estudo.

4.4 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS AVALIADOS

4.4.1 Questionário

Para obtenção dos dados clínicos e demográficos dos participantes do estudo, um questionário foi aplicado após o consentimento e assinatura do TCLE por parte dos indivíduos elegíveis do estudo. Dentre as informações coletadas estão:

- a) Demográficas: idade, sexo biológico, contato telefônico;
- b) Laboratoriais: Resultado do teste rápido molecular e exames laboratoriais complementares (baciloscopia do escarro, cultura microbiológica do escarro, teste tuberculínico, sorologia para HIV);
- c) Clínicas: histórico de tuberculose prévia ou contato próximo, histórico de uso de drogas lícitas e ilícitas, histórico uso de medicações concomitantes, histórico de vacinação com BCG, sintomatologia da TB (tosse, febre, hemoptise, dispneia), comorbidades (diabetes, doença autoimune)

4.4.2 Coleta de sangue

Foi coletado, por punção venosa, cerca de 24 mL de sangue dos voluntários, para realização dos ensaios laboratoriais do estudo. Cerca de 20 mL de sangue foi coletado em tubos com heparina (10 mL), que foram destinados a realização do isolamento das células mononucleares do sangue periférico. Cerca de 4 mL de sangue foram coletados nos tubos específicos para verificação do status de infecção pelo Mtb através do kit comercial QuantiFERON TB Gold-Plus in Tube (QFT-IT; Cellestis, Inc., Carnegie, Australia).

4.4.3 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico

Para isolamento das CMSP, foi realizada a técnica de gradiente de densidade com o meio Ficoll-Paque. O sangue heparinizado (20 mL), proveniente da coleta por punção venosa, é transferido para um tubo cônico do tipo Falcon (50 mL). Em seguida, foi adicionado 20 mL da solução tampão de fosfato salino na concentração de 1x (PBS 1x) no tubo contendo o sangue, totalizando uma solução 40 mL de sangue diluído em PBS 1x. Em outro tubo cônico (50 mL), foi transferido 10 mL de Ficoll (Histopaque®-1077/Sigma-Aldrich). O sangue diluído em PBS 1x foi transferido, por inversão, ao tubo contendo Ficoll, e centrifugado por 30 minutos, a velocidade de 1.500 rotações por minuto (RPM), em temperatura ambiente e com mínima desaceleração. Após a centrifugação, as células foram coletadas e transferidas para um tubo Falcon (15 mL). Para remoção dos resíduos de Ficoll, as células foram lavadas por centrifugação três vezes. As células foram ressuspensas em 1-3 mL de meio RPMI-1640 (Gibco®- Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SBF) e 1% de antibiótico-antimicótico 100x (Gibco®- Thermo Fisher Scientific). Uma alíquota da CMSP foi diluída (1/10) em solução Trypan Blue (Gibco®- Thermo Fisher Scientific), para contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram transferidas para um criotubo contendo 1mL de solução de congelamento (90% de SBF + 10% de DMSO) e armazenadas em nitrogênio líquido para as análises posteriores.

4.4.4 Estímulo *in vitro* das CMSP com os lipídios do *M. Tuberculosis*

Após descongelamento, um total de 1×10^6 células/mL foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®- Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SBF) e 1% de antibiótico-antimicótico 100x (Gibco®- Thermo Fisher Scientific), em placa de 24 poços pré-sensibilizada com o extrato apolar de lipídios do *M. tuberculosis*, cepa *Erdman*, durante 18 horas à 37°C, 5% de CO² em estufa de cultura. Para o controle não estimulado, as CMSP foram cultivadas em poços sem a presença do extrato lipídico. O extrato lipídico utilizado nesse estudo foi extraído conforme descrito por Petrilli et al, 2020.

4.4.5 Análise das subpopulações de linfócitos por Citometria de Fluxo

Após o estímulo *in vitro* por 18 horas, os sobrenadantes de cultura foram transferidos para microtubos de 0,6 mL e armazenados à -20°C. As células foram lavadas com solução de

PBS 1x + EDTA a 0,5 M, e incubadas por 30 minutos com os seguintes anticorpos para marcadores de superfície: CD3 (FITC), CD4 (Pacific Blue), CD8 (APC-Cy7), CD45RO (Alexa Fluor 700). Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1x, e permeabilizadas com CytoFix/CytoPerm (Becton Dickison ®). Para marcação intracelular, as células foram incubadas por 30 minutos com os seguintes anticorpos: Granzima B (APC), IFN- γ (PE), TNF- α (PE) e IL-10 (PE). Após a última etapa de lavagem, as células foram mantidas em PBS 1x para aquisição no Citômetro de fluxo convencional (BD LSRFortessa).

4.4.6 Análise das citocinas do sobrenadante por ELISA

Os sobrenadantes de cultura dos grupos avaliados foram coletados e armazenados à -20 °C para análise de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-10) pelo ensaio de imunoabsorção enzimática do tipo sanduíche (do inglês – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Em resumo, após sensibilização das placas de 96 poços com anticorpo de captura, 100 μ L do padrão e amostras foram incubadas por 2 horas. Após esse período, 100 μ L do anticorpo de detecção conjugado a enzima HRP foi transferido para todos os poços e incubados por até 1 hora. Finalmente, após transferir 100 μ L da solução substrato, a reação enzimática foi parada com ácido sulfúrico à 2M. Por fim, a absorbância foi quantificada por espectrofotometria com laser de 450 nm. Todos os procedimentos foram seguidos de acordo com o protocolo da fabricante (BD Bioscience). As concentrações (pg/mL) foram calculadas utilizando a curva padrão.

4.5 PROPOSTA DE ANÁLISE

Os dados obtidos foram organizados e analisados por meio do programa GraphPad Prism v. 8.0.1 (GraphPad Inc., San Diego, CA). A análise dos dados obtidos no citômetro foi realizada no programa FlowJo™ v. 10.7.1 (TreeStar, San Carlos, CA, USA). A estratégia utilizada para identificação das subpopulações foi demonstrada na **Figura 5**. Variáveis categóricas e numéricas serão descritas em tabelas através da frequência absoluta (n), relativa (%); mediana, desvio padrão (DP) ou intervalo interquartil (IQR), respectivamente. Dentre as variáveis que foram analisadas, destaca-se sexo biológico, idade, resultado da baciloscopia e cultura microbiológica do escarro, presença de cicatriz vacinal etc. Gráficos de barras com pontos de dispersão foram utilizados para comparar a frequência relativa das células (%) e intensidade média de fluorescência (IMF) entre os grupos estudados. O teste Shapiro Wilk foi utilizado para avaliação da distribuição dos dados. O teste T ou Wilcoxon foram utilizados para

análise de até 2 grupos. O teste Kruskal-Wallis ou One Way ANOVA foram utilizados para comparação 3 ou mais grupos e o teste de Dunn para múltiplas comparações. O nível de significância foi estabelecido para valores de $p < 0,05$.

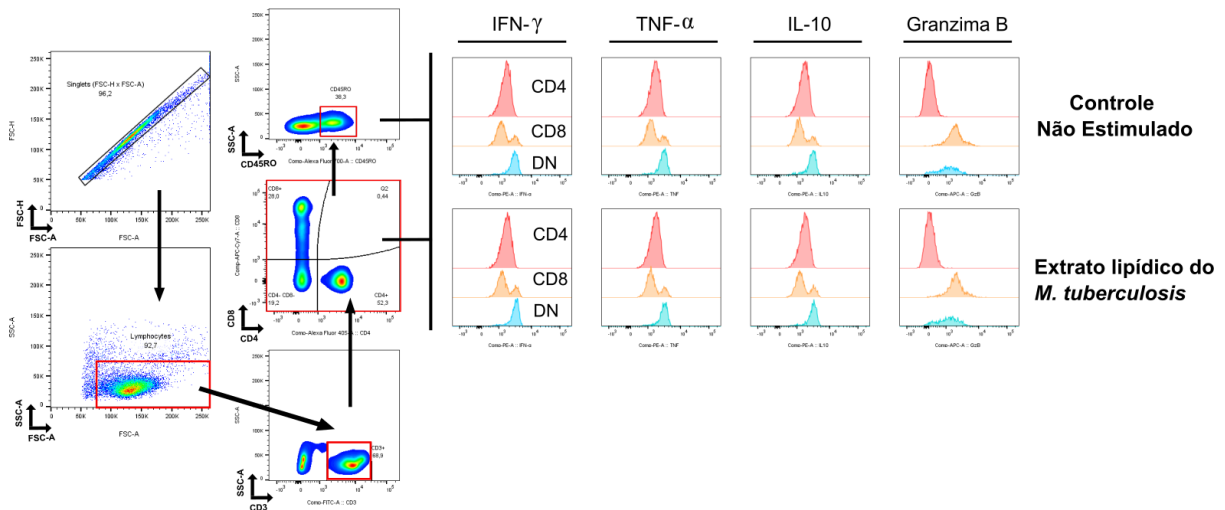


Figura 5 - Estratégia de seleção das subpopulações de linfócitos T. Após a exclusão dos eventos duplos, os linfócitos foram selecionados mediante tamanho e complexidade celular, sendo confirmados pela expressão positiva do CD3. Posteriormente, as populações de linfócitos Duplo negativos, CD4 e CD8 totais e de memória (CD45RO⁺) foram selecionados, e a expressão de IFN-g, TNF- α e IL-10 nas amostras não estimuladas e estimuladas com extrato lipídico do Mtb.

Fonte: Autoria própria

5 RESULTADOS

5.1 FLUXOGRAMA DE RECRUTAMENTO E AVALIAÇÃO DA CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS VOLUNTÁRIOS

Entre janeiro de 2021 e janeiro de 2022, 73 indivíduos foram recrutados e incluídos no estudo. Dentre esses, 27 (36,9%) foram excluídos pois apresentaram amostras insuficientes para análise, diagnóstico negativo para TB ativa ou o IGRA foi indeterminado. Os indivíduos elegíveis para a análise (N=46) foram alocados em quatro grupos, sendo estes: 13 indivíduos com TB ativa (TB), nove indivíduos com tuberculose latente (TBL), 12 indivíduos contatos domiciliares com IGRA negativo (CSC) e 12 indivíduos não contatos domiciliares (CSNC) (Figura 6).

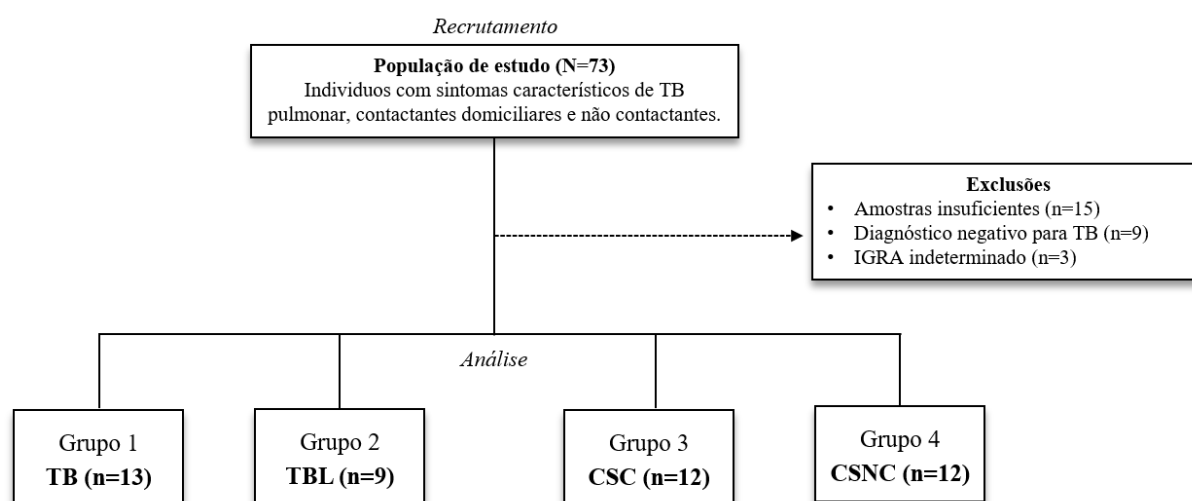


Figura 6 - Fluxograma de recrutamento dos indivíduos elegíveis.

Fonte: Autoria própria

As principais características clínicas e demográficas dos indivíduos avaliados obtidas através de questionário foram descritas na tabela 1. Não houve diferença estatística das características avaliadas entre os grupos, como idade ($p=0,0601$), vacinação com BCG ($p=0,354$) e presença de cicatriz vacinal ($p=0,149$). No entanto, apesar do recrutamento ter sido realizado por livre demanda, houve um maior número de indivíduos do sexo masculino no grupo TB e feminino nos outros ($p = 0,021$).

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos indivíduos do estudo.

Características clínicas e demográficas	TB (n=13)	TBL (n=9)	CSC (n=12)	CSNC (n=12)	Valor p
Idade, anos (mediana ± DP)	33,3 ± 9,3	38,0 ± 7,9	38,0 ± 5,9	29,0 ± 8,2	0,06 ^a
Sexo biológico, n (%)					
Masculino	9 (70)	2 (22)	2 (17)	3 (25)	0,02^b
Feminino	4 (30)	7 (78)	10 (83)	9 (75)	
Xpert MTB/RIF, n (%)					
Positivo	13 (100)	-	-	-	-
Negativo	0 (0)	-	-	-	-
Baciloscopia, n (%)					
Negativo	1 (8)	-	-	-	-
1+	3 (23)	-	-	-	-
2+	0 (0)	-	-	-	-
3+	7 (54)	-	-	-	-
NR	2 (15)	-	-	-	-
Cultura bacteriológica, n (%)					
Negativo	0 (0)	-	-	-	-
1+	3 (24)	-	-	-	-
2+	0 (0)	-	-	-	-
3+	5 (38)	-	-	-	-
NR	5 (38)	-	-	-	-
IGRA, n (%)					
Positivo	-	9 (100)	0 (0)	0 (0)	-
Negativo	-	0 (0)	12 (0)	12 (0)	-
Vacina BCG, n (%)					
Sim	12 (92)	9 (100)	9 (75)	12 (100)	0,35 ^b
Não	0 (0)	0 (0)	1 (8)	0 (0)	
Não sabe	1 (8)	0 (0)	2 (17)	0 (0)	
Cicatriz BCG, n (%)					
Sim	11 (85)	8 (89)	8 (67)	12 (100)	0,14 ^b
Não	2 (15)	1 (11)	4 (33)	0 (0)	

TB: Tuberculose; TBL: Tuberculose Latente; CSC: Controle Saudáveis Contatos; CSNC: Controle Saudáveis Não Contatos; DP: Desvio padrão; IGRA: *Interferon Gamma Release Assay*; BCG: Bacille Calmette-Guérin; +: Grau de positividade

^a Teste Kruskal-Wallis

^b Teste Qui-Quadrado

Fonte: Autoria própria

5.2 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T CD4⁺ NÃO ESTIMULADOS

A figura 7 representa a análise percentual de linfócitos T CD4⁺ totais (**Figura 7A**) e de memória (**Figura 7B**) produtores das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 após cultura de CMSP sem

estímulo. A estratégia para seleção das subpopulações de linfócitos foi descrita na Figura 5. Não foi observada diferenças estatisticamente significantes nas frequências de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocinas entre os grupos avaliados. No entanto, as frequências de linfócitos T CD4⁺ totais e de memória produtoras de TNF- α ($p = 0,05$ e $0,08$, respectivamente) tenderam a ser menores em CMSP de indivíduos com TBL quando comparada as células de indivíduos com TB ativa.

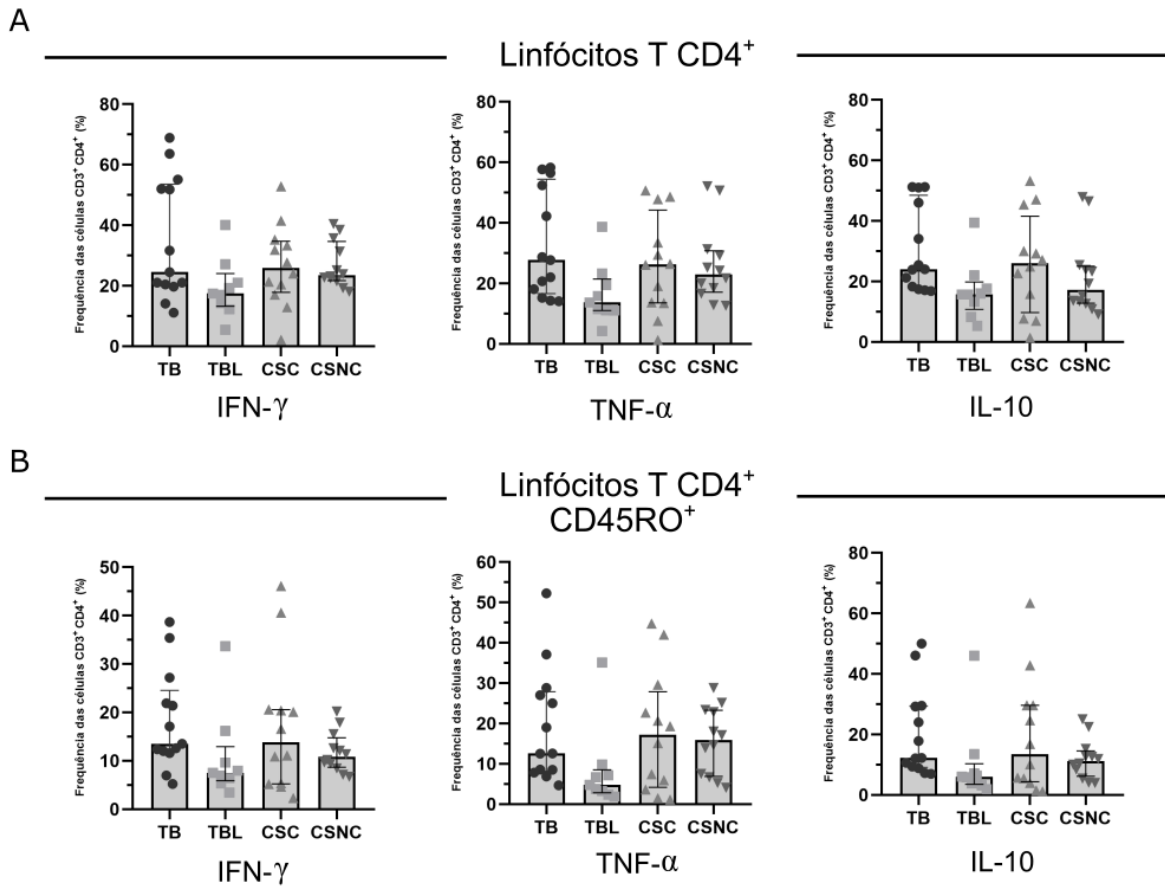


Figura 7 - Análise da frequência de linfócitos T CD4⁺ totais (A) e memória (B) após cultura de CMSP por 18 horas sem estímulo. Os resultados foram representados como mediana \pm IQR. A significância estatística foi avaliada pelo teste Kruskal Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Significância considerada foi $p < 0,05$. TB= Indivíduos com Tuberculose; TBL= Indivíduos com infecção latente; CSC= Controle Saudável Contato (Não infectado); CSNC= Controle Saudável não contato.

Fonte: Autoria própria

5.3 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T CD8⁺ NÃO ESTIMULADOS

A figura 8 representa a análise percentual de linfócitos T CD8⁺ totais (**Figura 8A**) e de memória (**Figura 8B**) produtores das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e Granzima B após cultura de CMSP sem estímulo. Os indivíduos com TBL apresentaram uma menor frequência de linfócitos T CD8⁺ totais produtores das citocinas IFN- γ ($p=0,03$), TNF- α ($p=0,03$) e IL-10

($p=0,01$), quando comparado aos indivíduos com TB ativa e aos controles saudáveis (CSC e CSNC). Além disso, a frequência de linfócitos T $CD8^+$ de memória produtores de $TNF-\alpha$ ($p=0,002$) e IL-10 ($p=0,0005$) em CMSP de indivíduos com TBL foi quase três vezes menor do que em CMSP dos indivíduos com TB ativa.

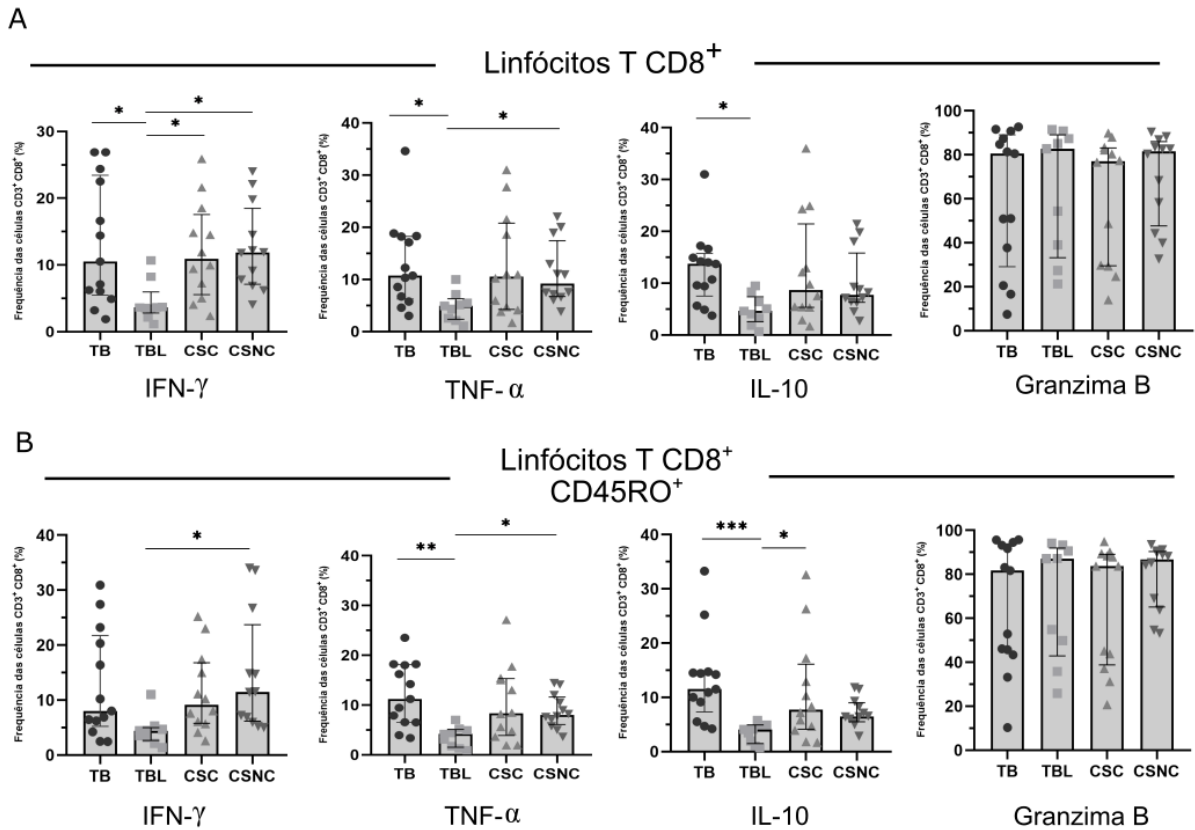


Figura 8 - Análise da frequência de linfócitos T $CD8^+$ totais (A) e memória (B) após cultura de CMSP por 18 horas sem estímulo. Os resultados foram representados como mediana \pm IQR. A significância estatística foi avaliada pelo teste Kruskal Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Significância considerada foi * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. TB= Indivíduos com Tuberculose; TBL= Indivíduos com infecção latente; CSC= Controle Saudável Contato (Não infectado); CSNC= Controle Saudável não contato

Fonte: Autoria própria

Interessantemente, foram identificadas duas subpopulações de linfócitos T $CD8^+$ expressando níveis distintos da glicoproteína CD8 na superfície celular. Essas células foram classificadas em $CD8^{hi}$ e $CD8^{lo}$, que foram os linfócitos com alta e baixa expressão de CD8, respectivamente. A estratégia para seleção destas subpopulações foi demonstrada na figura 9A. Como demonstrado na Figura 9B e 9C, o grupo TB apresentou uma maior frequência de linfócitos T $CD8^{hi}$ totais e $CD8^{hi}$ de memória produtores de citocinas comparado ao grupo TBL. Essa diferença foi seis vezes maior nos linfócitos T $CD8^{hi}$ totais e memória produtores de $TNF-\alpha$, e cerca de quatro e cinco vezes maior em linfócitos T $CD8^{hi}$ totais e de memória produtores

de IFN- γ e IL-10, respectivamente. Além disso, apesar de não ter tido diferença estatística, a frequência das células supracitadas tendeu a ser menor nos grupos controles quando comparado ao grupo de indivíduos diagnosticados com TB ativa ($p>0,05$). Não houve diferença entre os percentuais dos linfócitos T CD8^{hi} totais e de memória produtores de Granzima B entre os grupos avaliados (**Figura 9B e 9C**).

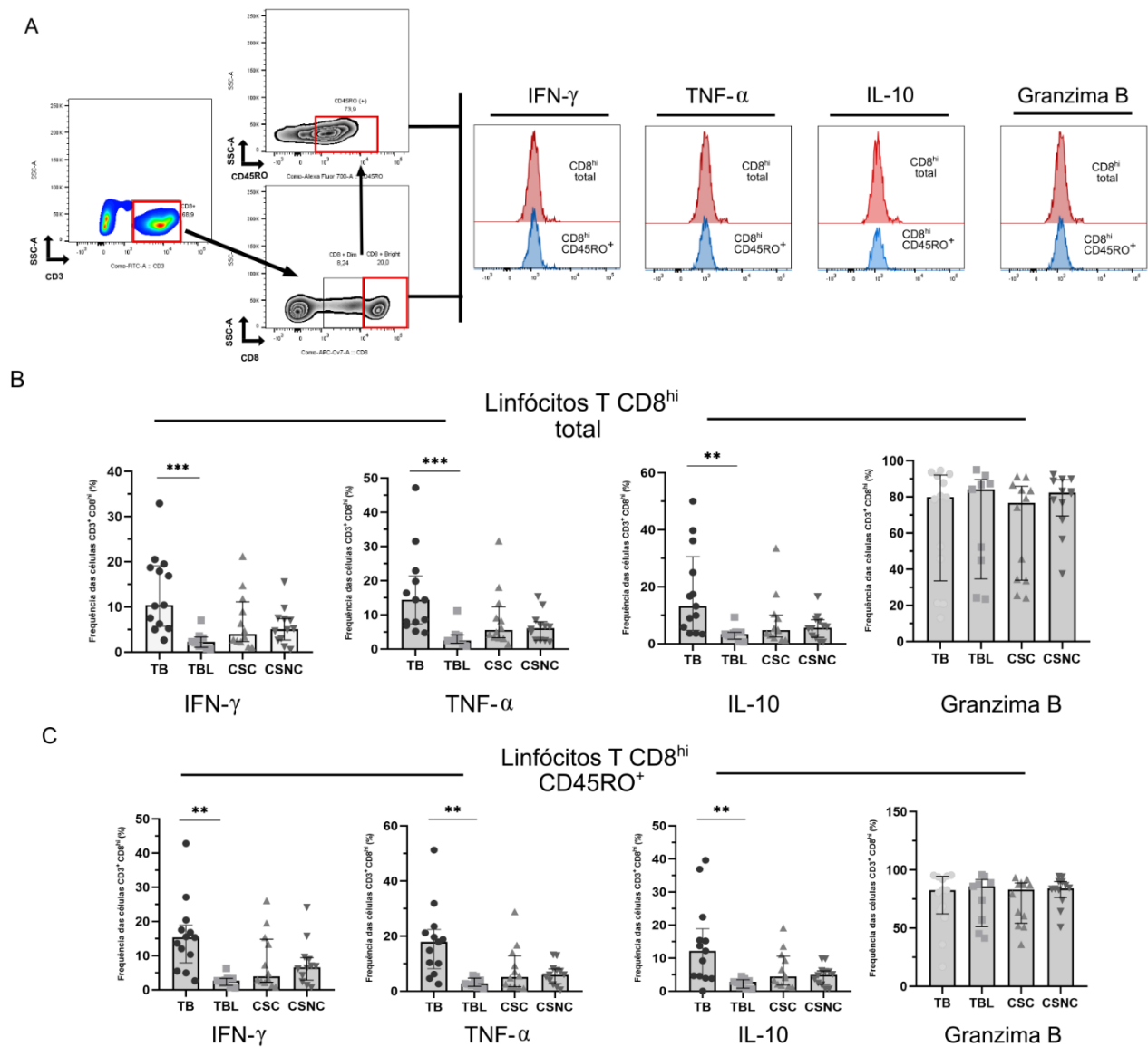


Figura 9 - Análise da frequência de linfócitos T CD8^{hi} totais (**B**) e memória (**C**) após cultura de CMSP por 18 horas sem estímulo. A estratégia de seleção das subpopulações de linfócitos T CD8^{hi} (**A**). Os resultados foram representados como mediana \pm IQR. A significância estatística foi avaliada pelo teste Kruskal Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Significância considerada foi * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. TB= Indivíduos com Tuberculose; TBL= Indivíduos com infecção latente; CSC= Controle Saudável Contato (Não infectado); CSNC= Controle Saudável não contato

Fonte: Autoria própria

5.4 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T DUPLO-NEGATIVOS ($CD3^+ CD8^- CD4^-$) NÃO ESTIMULADOS

Os linfócitos T duplo negativos representam uma pequena subpopulação de linfócitos T no sangue periférico (WU et al., 2022). Além disso, pouco estudos realizaram uma avaliação funcional destas células na TB. Como demonstrado na figura 10A e 10B, a frequência destas células (totais e de memória, respectivamente) produtoras de citocinas e Granzima B foi semelhante entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Curiosamente, embora sem diferença significativa, a frequência dos linfócitos DN totais produtores de Granzima B em indivíduos com TBL tendeu ser 3 vezes menor em comparação com o grupo TB ($p = 0,409$).

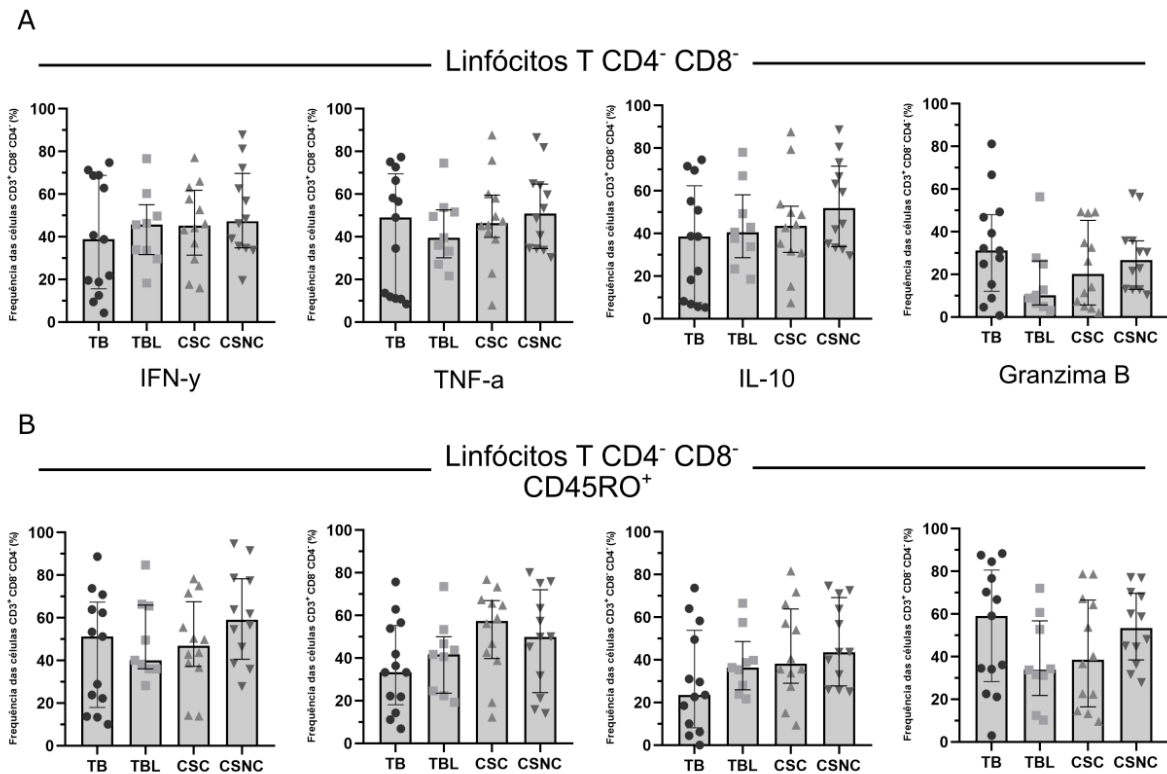


Figura 10 - Análise da frequência de linfócitos T duplo negativos totais (**A**) e memória (**B**) após cultura de CMSP por 18 horas sem estímulo. Os resultados foram representados como mediana \pm IQR. A significância estatística foi avaliada pelo teste Kruskal Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Significância considerada foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. TB= Indivíduos com Tuberculose; TBL= Indivíduos com infecção latente; CSC= Controle Saudável Contato (Não infectado); CSNC= Controle Saudável não contato

Fonte: Autoria própria

5.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO *Mycobacterium tuberculosis*

Para avaliar a resposta funcional de linfócitos T induzida aos lipídios do Mtb, CMSP isoladas de indivíduos com TB ativa, TBL e controles saudáveis foram incubadas por 18 horas com extrato lipídico da parede celular do Mtb.

Em comparação com o controle não estimulado, os lipídios induziram um aumento da produção de IFN- γ ($p=0,012$) e TNF- α ($p=0,020$), mas não IL-10, por linfócitos T CD4⁺ em CMSP de contatos domiciliares não infectados (CSC) (**Figura 11A**). Em contrapartida, somente linfócitos T CD8^{hi} de indivíduos com TB ativa foram capazes de produzir maiores níveis de TNF- α ($p=0,049$), IL-10 ($p=0,031$) e Granzima B ($p=0,006$), mas não IFN- γ , após estímulo com os lipídios (**Figura 11B**). Curiosamente, esse padrão de resposta foi novamente observado em linfócitos T CD8^{hi} de memória produtores TNF- α , IL-10 e Granzima B em CMSP de indivíduos com TB ativa após estímulo com lipídios (**Figura 12**). Em relação aos linfócitos DN, os lipídios não foram capazes de induzir a expressão de citocinas e granzima B em nenhum dos grupos avaliados ($p>0,05$) (**Figura 11C**).

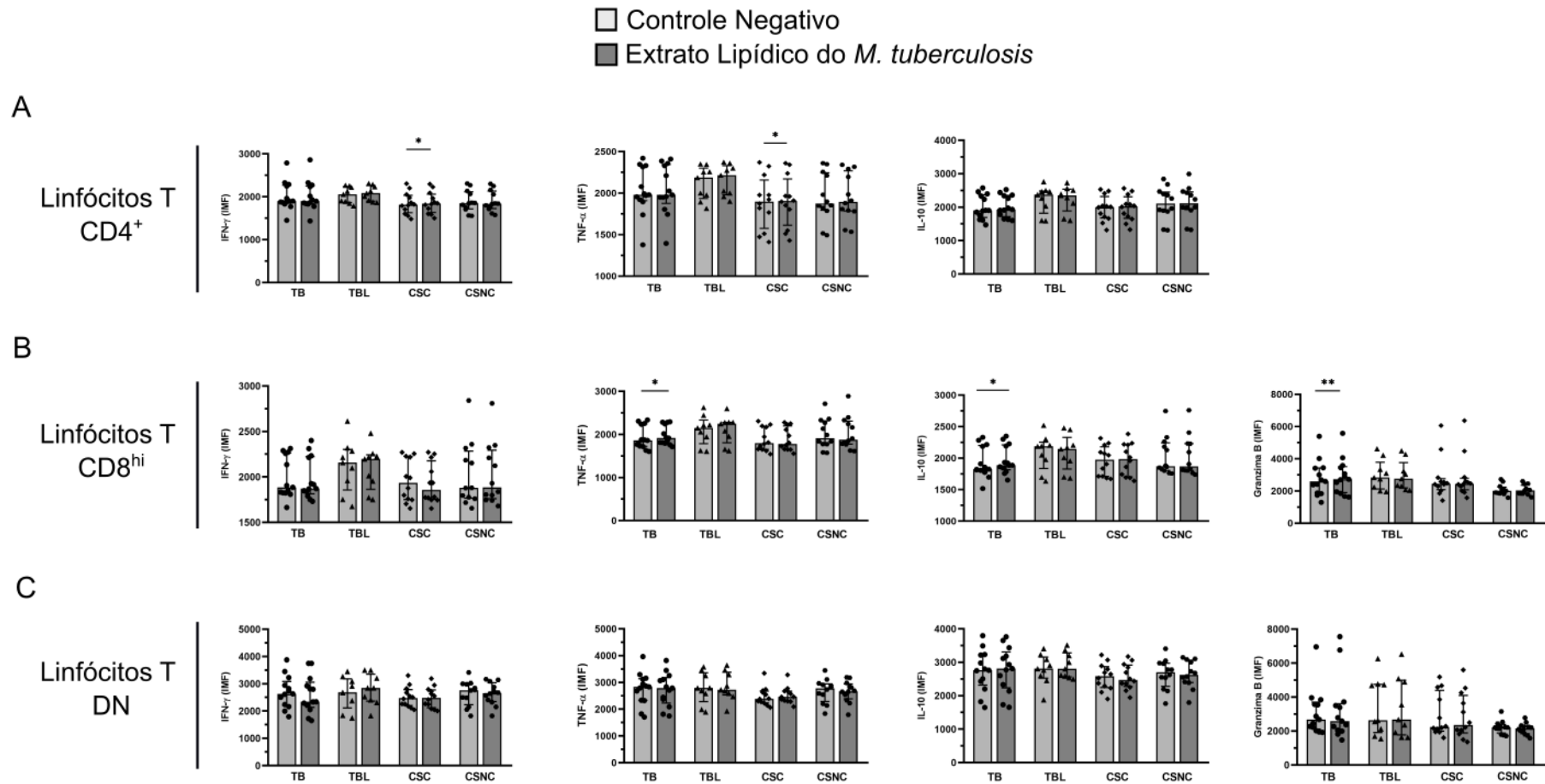


Figura 11 - Análise da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e Granzima B por linfócitos T CD4⁺ (A), CD8^{hi} (B) e DN (C) após cultura de CMSP não estimuladas e estimuladas por 18 horas com extrato lipídico da parede celular do *M. tuberculosis*. Os resultados foram representados como mediana \pm IQR da intensidade média de fluorescência (IMF). A significância estatística foi avaliada pelo teste Wilcoxon. Significância considerada foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. TB= Indivíduos com Tuberculose; TBL= Indivíduos com infecção latente; CSC= Controle Saudável Contato (Não infectado); CSNC= Controle Saudável não contato
Fonte: Autoria própria

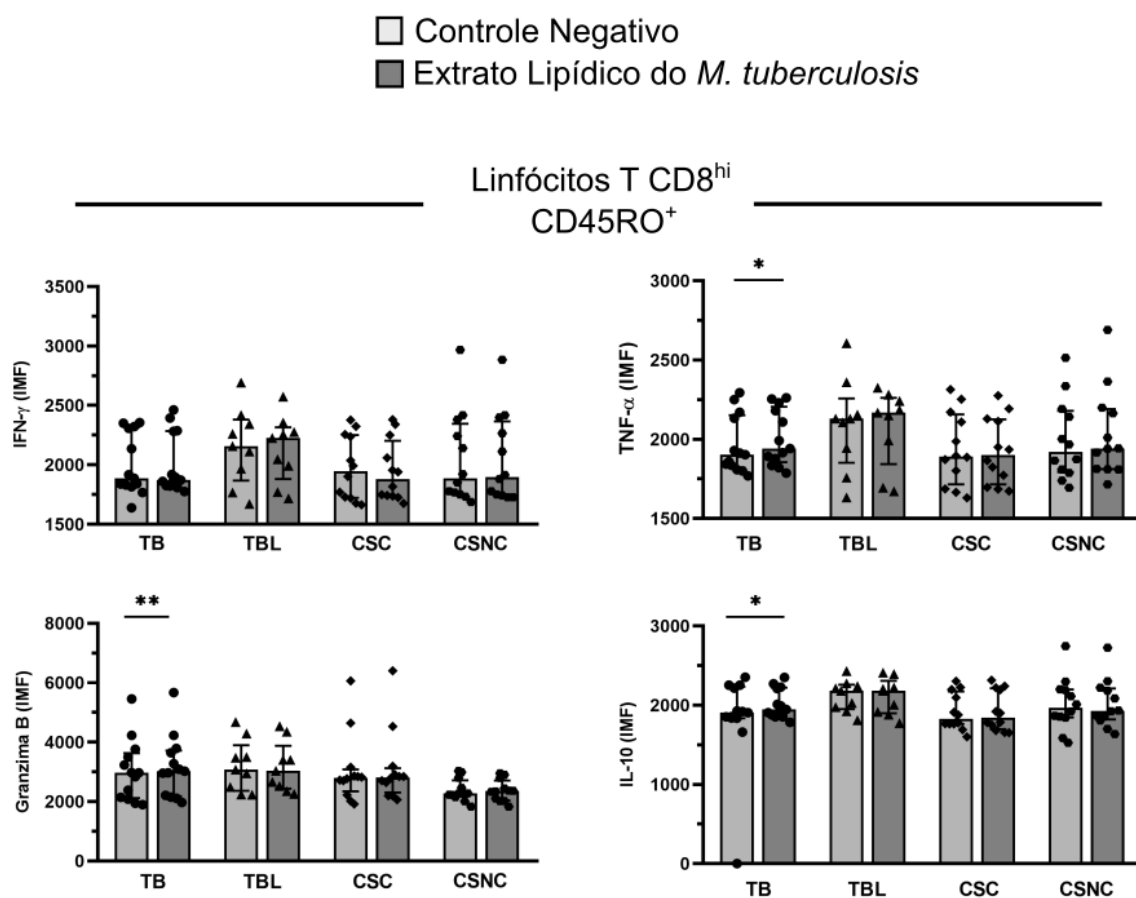


Figura 12 - Análise da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e Granzima B por linfócitos T CD8^{hi} de memória após cultura de CMSP não estimuladas e estimuladas por 18 horas com extrato lipídico da parede celular do *M. tuberculosis*. Os resultados foram representados como mediana \pm IQR da intensidade média de fluorescência (IMF). A significância estatística foi avaliada pelo teste Wilcoxon. Significância considerada foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. TB= Indivíduos com Tuberculose; TBL= Indivíduos com infecção latente; CSC= Controle Saudável Contato (Não infectado); CSNC= Controle Saudável não contato

Fonte: Autoria própria

5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS POR LIPÍDIOS EM CULTURA DE CMSP

Os níveis de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 induzidas por lipídios do *M. tuberculosis* foram avaliados em sobrenadantes de cultura de CMSP de indivíduos com TB ativa, TB latente e os controles saudáveis (**Figura 13**).

Em relação ao controle não estimulado, os lipídios induziram um aumento da produção de IFN- γ ($p=0,003$) somente por CMSP de contatos domiciliares não infectados (CSC). Em contrapartida, os lipídios foram fortes indutores de TNF- α em todos os grupos avaliados.

Curiosamente, os níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura do grupo CSC foram aproximadamente 9 vezes maiores após o estímulo com os lipídios ($p=0,001$).

Diferentemente das citocinas pró-inflamatórias, os lipídios induziram uma diminuição dos níveis de IL-10 ($p=0,017$) em CMSP de indivíduos saudáveis não contatos. Essa resposta não foi observada para os demais grupos.

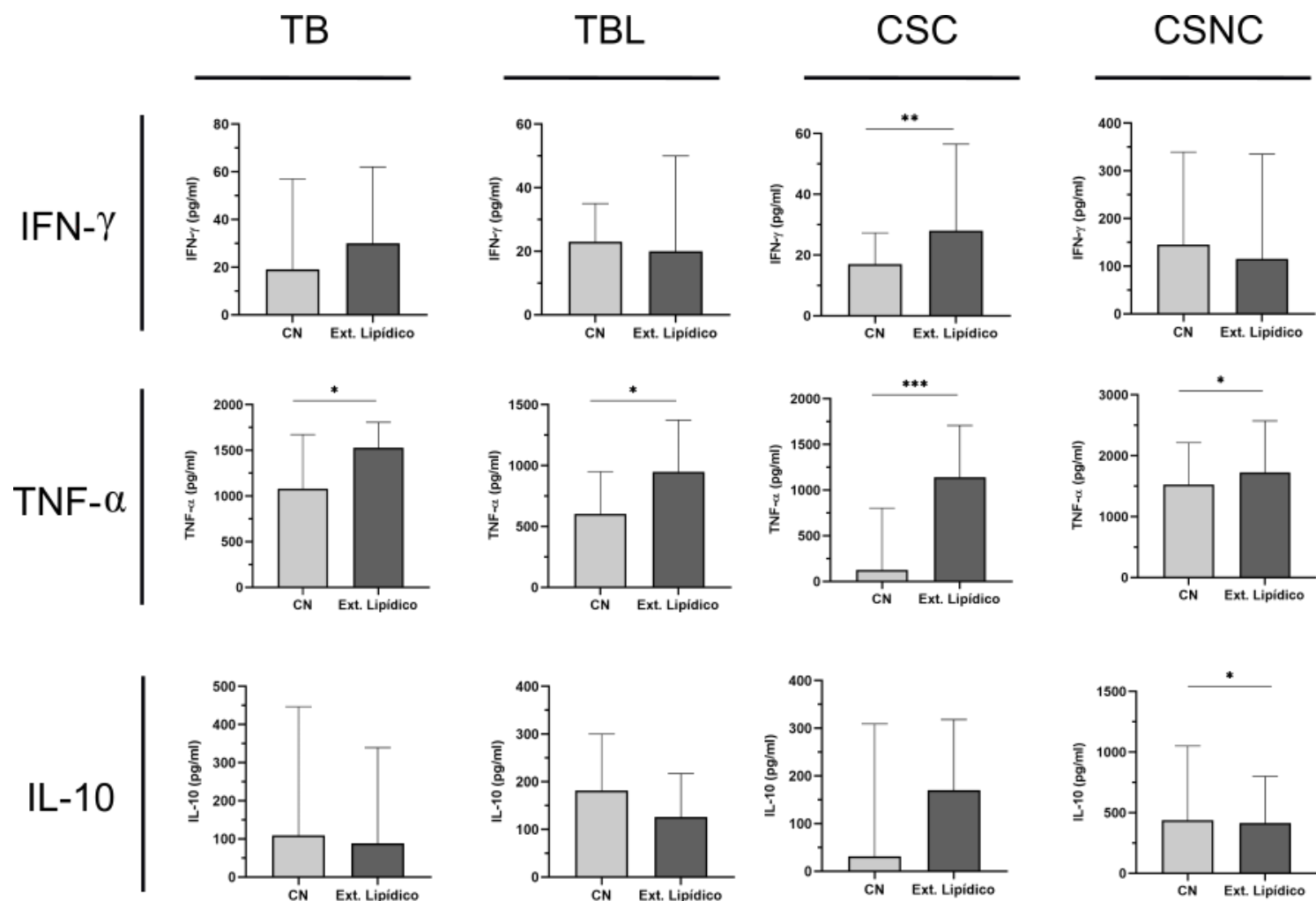


Figura 13 - Avaliação dos níveis de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP estimuladas por 18 horas com extrato lipídico do *M. tuberculosis*. Os resultados foram representados como mediana \pm IQR da concentração de citocinas (pg/mL). A significância estatística foi avaliada pelo teste Wilcoxon. Significância considerada foi * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. TB= Indivíduos com Tuberculose; TBL= Indivíduos com infecção latente; CSC= Controle Saudável Contato (Não infectado); CSNC= Controle Saudável não contato

Fonte: Autoria própria

6 DISCUSSÃO

Os linfócitos T desempenham papel importante no controle de infecções ocasionada por patógenos. No contexto da infecção pelo Mtb, o estudo destas células concentrou-se na resposta induzida por antígenos peptídicos micobacterianos. No entanto, na fase inicial da infecção, os lipídios da parede celular do Mtb iniciam a interação com as células imunes do hospedeiro (GARCIA-VILANOVA; CHAN; TORRELLES, 2019).

A resposta imune induzida pelos lipídios do Mtb tem sido avaliada. No entanto, esses estudos foram baseados em cepas de Mtb geneticamente modificadas com foco em células imunes inatas ou não avaliaram as respostas imunes induzidas pelos lipídios do Mtb em uma perspectiva populacional. Neste estudo, foi caracterizado a resposta funcional de linfócitos T induzida pelo extrato lipídico total do Mtb em células isoladas de indivíduos com TB ativa, infecção latente e controle saudáveis.

Apesar dos esforços em diminuir a influência de fatores confundidores na avaliação dos resultados, observamos um maior percentual de voluntários do sexo feminino no grupo TBL e controles saudáveis em comparação com o grupo TB. Alguns estudos avaliaram a influência do sexo biológico na resposta imune. Em geral, o sexo feminino possui respostas imunes mais robustas a desafios antigênicos, como infecção e vacinação, do que o sexo masculino (FISH, 2008). No entanto, não está claro como o sexo biológico influencia diretamente na resposta imune ao *M. tuberculosis* (NHAMOYEBONDE; LESLIE, 2014). Aqui, não foi possível mensurar o real impacto dessa diferença observada na capacidade dos linfócitos T a responderem aos lipídios do *M. tuberculosis*.

Apesar de não ter sido o objetivo principal do estudo, foi observado que o perfil global dos linfócitos T entre os grupos avaliados era distinto, mesmo quando as células foram cultivadas sem a presença dos lipídios. Foi observado uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ totais e de memória produtoras de citocinas em CMSP de indivíduos com TB ativa comparado ao grupo TBL. Além disso, esse perfil distinto entre os indivíduos com TB ativa e TB latente ficou evidente quando os linfócitos T CD8^{hi} totais e de memória produtores de citocinas foram avaliados. Entretanto, esse perfil de resposta não foi observado em linfócitos T CD4⁺, CD8^{lo} (dados não mostrados) e DN. Especula-se que os linfócitos T CD8⁺ e, principalmente os linfócitos T CD8^{hi}, são umas das principais subpopulações durante a resposta imune na TB ativa, tendo um papel importante na resposta efetora na fase ativa de replicação do *M. tuberculosis* mediante produção de citocinas. É possível que durante a doença ativa, os linfócitos T CD8^{hi} são recrutados ativamente para controlar a alta replicação bacteriana no sítio

da infecção, refletindo no aumento da frequência dessas células no sangue periférico. No entanto, na infecção latente, a baixa frequência dessas células em amostras de CMSP pode acontecer devido à baixa carga bacteriana. Anteriormente, alguns estudos demonstraram uma maior prevalência de linfócitos T CD8⁺ específicos ao *M. tuberculosis* em amostras de indivíduos com TB ativa em relação as amostras de indivíduos com TB latente, e o aumento da frequência e expressão de citocinas foi associada positivamente com a carga bacteriana (DAY et al., 2011; ROZOT et al., 2013; POLLOCK et al., 2013; SILVA et al., 2014) e com o tratamento (AXELSSON-ROBERTSON et al., 2015). Curiosamente, cerca de 54% e 38% dos pacientes com TB ativa incluídos no estudo também tinham uma alta carga bacteriana demonstrada nos exames de baciloscopia e cultura bacteriológica do escarro, respectivamente (**Tabela 1**).

Ao avaliar a resposta imune *in vitro* aos lipídios do *M. tuberculosis*, observa-se um aumento da expressão de IFN- γ e TNF- α por linfócitos T CD4⁺ estimulados por lipídios, somente em CMSP de contatos domiciliares não infectados. Curiosamente, o aumento da concentração de IFN- γ em sobrenadante de cultura após estímulo também só foi observada nesse grupo, ao passo que a produção de TNF- α foi 9 vezes aumentada quando comparada ao controle não estimulado. Em conjunto, esses dados sugerem que a exposição ao *M. tuberculosis* pode não ser detectada completamente pelo IGRA comercial utilizado neste estudo. Os IGRAs são baseados na quantificação da produção de IFN- γ por linfócitos T após estimulação com antígenos peptídicos do *M. tuberculosis*, como o ESAT-6 e o CFP-10 (PAI et al., 2014). Esses antígenos são secretados pelo bacilo via sistema de secreção ESX-1 durante a infecção em macrófagos, sendo determinante na persistência da infecção (GANGULY; SIDDIQUI; SHARMA, 2008). No entanto, apesar desses antígenos serem importantes na imunopatogênese, a resposta imune ao Mtb é iniciada a partir da interação das células imunes com o parede celular do bacilo, composto em sua maioria por carboidratos e lipídios imunogênicos (~80%) fundamentais para o desfecho da infecção (GARCIA-VILANOVA; CHAN; TORRELLES, 2019). Portanto, a inclusão de antígenos lipídicos pode ser uma alternativa para melhorar a capacidade dos testes comerciais disponíveis em detectar a exposição ao *M. tuberculosis*.

Observa-se também o aumento da expressão de TNF- α , IL-10 e Granzima B por linfócitos T CD8^{hi} totais e de memória após estímulo com lipídios somente em CMSP de pacientes com TB ativa. No entanto, essa resposta não foi observada para os linfócitos T CD8⁺ totais e CD8^{lo}. Recentemente, James e colaboradores (2022) demonstraram que a alta expressão do co-receptor CD8 (CD8^{hi}) é suficiente para aumentar a avidéz funcional do receptor TCR ao sulfoglicolipídio do *M. tuberculosis* apresentando por CD1b (JAMES et al., 2022). A avidéz

funcional é definida como uma medida biológica que descreve quão bem um linfócito T responde *in vitro* a uma determinada concentração de um antígeno, ao qual pode ser medida pela produção de citocinas e capacidade de citotoxicidade ou proliferação (VIGANÒ et al., 2012). Além disso, a maturação da avidéz funcional de uma população de células T geralmente ocorre durante o curso de uma resposta imune e após reexposição ao patógeno (VON ESSEN; KONGSBÄK; GEISLER, 2012). Especula-se que, durante a TB ativa, a reexposição antigênica dos linfócitos T CD8^{hi} aos lipídios do Mtb leva a maturação da avidéz funcional, e isso reflete na capacidade dessas células em reconhecer os antígenos lipídicos e, conseqüentemente, responder a reestimulação *in vitro* mediante a produção de citocinas e granzima B.

Somado a isso, anteriormente, foi observado que os linfócitos T CD8^{hi} eram células majoritariamente CD25⁺ e CD69⁺, tinham alta expressão do receptor TCR na superfície celular e alta expressão de genes relacionados com proliferação celular. Enquanto, os linfócitos T CD8^{lo} eram hiporesponsivos e tinham um perfil transcricional característico de senescência celular (alta expressão de genes pró-apoptóticos) (BALYAN et al., 2019). Isso explicaria parcialmente o porquê que os linfócitos T CD8^{hi}, mas não os linfócitos T CD8^{lo}, tinham uma maior frequência em CMSP não estimuladas de indivíduos com TB ativa e somente essas células foram capazes de responder a reestimulação *in vitro*.

Para avaliar a capacidade das CMSP na secreção de citocinas em resposta aos lipídios, avaliou-se a concentração das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 nos sobrenadantes de cultura. Infelizmente, não foi possível avaliar a granzima B devido a indisponibilidade do kit comercial. Em relação ao IFN- γ , somente foi observado um aumento significativo da produção após o estímulo em CMSP de contatos domiciliares. Isso reforça a hipótese discutida anteriormente, no qual, esses indivíduos foram expostos ao *M. tuberculosis*. Ao contrário do IFN- γ , a concentração de TNF- α foi aumentada em todos os grupos avaliados após o estímulo com os lipídios. Recentemente, Silva e colaboradores (2021) demonstraram que os glicolipídios, LAM e PIM, induziram produção de TNF- α em sobrenadante de cultura de CMSP isoladas de pacientes com TB ativa, TB latente e, principalmente, em indivíduos saudáveis não contatos, corroborando com os resultados deste estudo (SILVA et al., 2021). O extrato lipídico do Mtb também induziu a produção de TNF- α por CMSP de indivíduos saudáveis não contatos (PETRILLI et al., 2020). Por fim, os lipídios não parecem modular a capacidade de CMSP em produzir IL-10 ou o tempo de 18 horas não foi suficiente para ser observado uma mudança no nível dessa citocina.

7 CONCLUSÕES

Os dados mostraram que a resposta dos linfócitos T ao extrato lipídico do Mtb não foi capaz de distinguir os grupos avaliados no estudo, após 18 horas de cultura. No entanto, os lipídios parecem ser bons indutores de IFN- γ e TNF- α por linfócitos T CD4⁺, bem como, na expressão de TNF- α , IL-10 e Granzima B por linfócitos T CD8^{hi} de indivíduos com TB.

Por fim, os lipídios são bons indutores de citocinas por CMSP, e essa resposta pode ser explorada em estudos de avaliação da resposta imunopatológica da TB.

REFERÊNCIAS

- ASTARIE-DEQUEKER, C. et al. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 2, p. e1000289, 2009.
- 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: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 32, p. 23–29, 2015.
- BALYAN, R. et al. Correlation of cell-surface CD8 levels with function, phenotype and transcriptome of naive CD8 T cells. **Immunology**, v. 156, n. 4, p. 384–401, 2019.
- BARRY, C. E., 3rd et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. **Progress in lipid research**, v. 37, n. 2–3, p. 143–179, 1998.
- BEKIERKUNST, A. Acute granulomatous response produced in mice by trehalose-6,6-dimycolate. **Journal of bacteriology**, v. 96, n. 4, p. 958–961, 1968.
- BELL, L. C. K.; NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–90, 2018.
- BLOCH, H. Studies on the virulence of tubercle bacilli; isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. **The journal of experimental medicine**, v. 91, n. 2, p. 197–218, pl, 1950.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose**. Brasília, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-numero-especial-marco-2022.pdf>>.
- BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 83, n. 1–3, p. 91–97, 2003.
- BUSCH, M. et al. Lipoarabinomannan-responsive polycytotoxic T cells are associated with protection in human tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 194, n. 3, p. 345–355, 2016.
- 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. e5528, 2009.
- CACCAMO, N. et al. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. **European journal of immunology**, v. 40, n. 8, p. 2211–2220, 2010.
- CANTRELL, S. A. et al. Free mycolic acid accumulation in the cell wall of the *mce1* operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 619–626, 2013.

- CHEGOU, N. N. et al. Potential of novel Mycobacterium tuberculosis infection phase-dependent antigens in the diagnosis of TB disease in a high burden setting. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 10, 2012.
- CHEN, C. Y. et al. A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000392, 2009.
- CILLONI, L. et al. The potential impact of the COVID-19 pandemic on the tuberculosis epidemic a modelling analysis. **EClinicalMedicine**, v. 28, n. 100603, p. 100603, 2020.
- COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.
- CONVERSE, S. E. et al. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and Mycobacterium tuberculosis virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 6121–6126, 2003.
- DAO, D. N. et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2067–2074, 2004.
- DAVIS, J. M.; RAMAKRISHNAN, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 37–49, 2009.
- DAY, C. L. et al. Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. **The journal of immunology**, v. 187, n. 5, p. 2222–2232, 2011.
- DE LIBERO, G.; MORI, L. Recognition of lipid antigens by T cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 6, p. 485–496, 2005.
- DE LIBERO, G.; MORI, L. The T-Cell Response to Lipid Antigens of Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 219, 2014.
- DOMENECH, P. et al. The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of Mycobacterium tuberculosis. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21257–21265, 2004.
- DUBNAU, E. et al. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of Mycobacterium tuberculosis in mice: Oxygenated mycolic acids in M. tuberculosis. **Molecular microbiology**, v. 36, n. 3, p. 630–637, 2000.
- FISH, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 737–744, 2008.
- FORRELLAD, M. A. et al. Role of the Mce1 transporter in the lipid homeostasis of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 94, n. 2, p. 170–177, 2014.

GANGULY, N.; SIDDIQUI, I.; SHARMA, P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 88, n. 6, p. 510–517, 2008.

GARCIA-VILANOVA, A.; CHAN, J.; TORRELLES, J. B. Underestimated manipulative roles of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope glycolipids during infection. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2909, 2019.

GILLERON, M. et al. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **The journal of experimental medicine**, v. 199, n. 5, p. 649–659, 2004.

GOREN, M. B. et al. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 7, p. 2510–2514, 1976.

GOREN, M. B.; BROKL, O.; SCHAEFER, W. B. Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: Phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid 1. **Infection and immunity**, v. 9, n. 1, p. 150–158, 1974.

GRANT, N. L. et al. T cell transcription factor expression evolves over time in granulomas from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cynomolgus macaques. **Cell reports**, v. 39, n. 7, p. 110826, 2022.

HARARI, A. et al. Dominant TNF- α + *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 372–376, 2011.

ISHIKAWA, E. et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. **The journal of experimental medicine**, v. 206, n. 13, p. 2879–2888, 2009.

JAMES, C. A. et al. CD4 and CD8 co-receptors modulate functional avidity of CD1b-restricted T cells. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 78, 2022.

JAMES, C. A.; SESHADRI, C. T cell responses to Mycobacterial glycolipids: On the spectrum of “innateness”. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 170, 2020.

KARAKOUSIS, P. C.; BISHAI, W. R.; DORMAN, S. E. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 2, p. 105–116, 2004.

KARBALAEI ZADEH BABAKI, M.; SOLEIMANPOUR, S.; REZAEI, S. A. Antigen 85 complex as a powerful *Mycobacterium tuberculosis* immunogene: Biology, immunopathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. **Microbial pathogenesis**, v. 112, p. 20–29, 2017.

LAUNOIS, P. et al. T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. **Infection and immunity**, v. 62, n. 9, p. 3679–3687, 1994.

- LAYRE, E. et al. Mycolic acids constitute a scaffold for mycobacterial lipid antigens stimulating CD1-restricted T cells. **Chemistry & biology**, v. 16, n. 1, p. 82–92, 2009.
- LAYRE, E. et al. A comparative lipidomics platform for chemotaxonomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry & biology**, v. 18, n. 12, p. 1537–1549, 2011.
- LEYTEN, E. M. S. et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and infection**, v. 8, n. 8, p. 2052–2060, 2006.
- LIN, P. L.; FLYNN, J. L. CD8 T cells and *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Seminars in immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 239–249, 2015.
- LINDESTAM ARLEHAMN, C. S. et al. Antigen for CD4 and CD8 T cells in tuberculosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a018465, 2014.
- LUGO-VILLARINO, G. et al. Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 405, 2012.
- MAHAIRAS, G. G. et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 5, p. 1274–1282, 1996.
- MARÍN, N. D. et al. Functional profile of CD4+ and CD8+ T cells in latently infected individuals and patients with active TB. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 93, n. 2, p. 155–166, 2013.
- MATHEMA, B. et al. Drivers of tuberculosis transmission. **The journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_6, p. S644–S653, 2017.
- MAYER-BARBER, K. D.; BARBER, D. L. Innate and adaptive cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 12, 2015.
- MEIER, N. R. et al. A systematic review on novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens and their discriminatory potential for the diagnosis of latent and active tuberculosis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2476, 2018.
- MENDUM, T. A. et al. Lipid metabolism and Type VII secretion systems dominate the genome scale virulence profile of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 372, 2015.
- MILLAR, J. A. et al. Spatial organization and recruitment of non-specific T cells may limit T cell-macrophage interactions within *Mycobacterium tuberculosis* granulomas. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 613638, 2020.
- MONTAMAT-SICOTTE, D. J. et al. A mycolic acid-specific CD1-restricted T cell population contributes to acute and memory immune responses in human tuberculosis infection. **The journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2493–2503, 2011.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 1, p. 42–48, [s.d.].

NHAMOYEBONDE, S.; LESLIE, A. Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. **The journal of infectious diseases**, v. 209 Suppl 3, n. suppl 3, p. S100-6, 2014.

NIGOU, J. et al. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. **Microbes and infection**, v. 4, n. 9, p. 945–953, 2002.
OMS. Organização Mundial da Saúde. **Relatório Global de Tuberculose 2021**. Disponível em:<<https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1379788/retrieve>>

PABST, M. J. et al. Inhibition of macrophage priming by sulfatide from Mycobacterium tuberculosis. **The journal of immunology**, v. 140, n. 2, p. 634–640, 1988.

PAI, M. et al. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 1, p. 3–20, 2014.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16076, 2016.

PAI, M.; BEHR, M. Latent Mycobacterium tuberculosis Infection and Interferon-Gamma Release Assays. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 5, 2016.

PETRILLI, J. D. et al. Differential host pro-inflammatory response to Mycobacterial cell wall lipids regulated by the Mce1 operon. **Frontiers in immunology**, v. 11, 2020.
POLLOCK, K. M. et al. T-cell immunophenotyping distinguishes active from latent tuberculosis. **The journal of infectious diseases**, v. 208, n. 6, p. 952–968, 2013.

QUESNIAUX, V. J. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. **The journal of immunology**, v. 172, n. 7, p. 4425–4434, 2004.

QUIDING-JÄRBRINK, M.; SMITH, D. A.; BANCROFT, G. J. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. **Infection and immunity**, v. 69, n. 9, p. 5661–5670, 2001.

RAKSHIT, S. et al. Circulating Mycobacterium tuberculosis DosR latency antigen-specific, polyfunctional, regulatory IL10+ Th17 CD4 T-cells differentiate latent from active tuberculosis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11948, 2017.

ROSAT, J. P. et al. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T cell pool. **The journal of immunology**, v. 162, n. 1, p. 366–371, 1999.

ROZOT, V. et al. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease: Immunity to infection. **European journal of immunology**, v. 43, n. 6, p. 1568–1577, 2013.

SHIMONO, N. et al. Hypervirulent mutant of Mycobacterium tuberculosis resulting from disruption of the mce1 operon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15918–15923, 2003.

SIDDIQUI, S.; VISVABHARATHY, L.; WANG, C.-R. Role of group 1 CD1-restricted T cells in infectious disease. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 337, 2015.

SILVA, B. D. DE S. et al. Different phenotypes of CD8⁺ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis. **Immunology letters**, v. 160, n. 1, p. 23–32, 2014.

SILVA, C. S. et al. High dimensional immune profiling reveals different response patterns in active and latent tuberculosis following stimulation with Mycobacterial glycolipids. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 727300, 2021.

SMITH, S. M. et al. Human CD8⁺ T cells specific for *Mycobacterium tuberculosis* secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in The Gambia. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 7144–7148, 2000.

SUTHERLAND, J. S. et al. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease: Immunity to infection. **European journal of immunology**, v. 39, n. 3, p. 723–729, 2009.

VIGANÒ, S. et al. Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 153863, 2012.

VAN PINXTEREN, L. A. H. et al. Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. **European journal of immunology**, v. 30, n. 12, p. 3689–3698, 2000.

VOLKMAN, H. E. et al. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. **PLoS biology**, v. 2, n. 11, p. e367, 2004.

VON ESSEN, M. R.; KONGSBAK, M.; GEISLER, C. Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 163453, 2012.

WU, Z. et al. CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (double-negative) T cells in inflammation, immune disorders and cancer. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 816005, 2022.

YANG, Y. et al. A hydrolase of trehalose dimycolate induces nutrient influx and stress sensitivity to balance intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 2, p. 153–163, 2014.

YUAN, Y. et al. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in Mycobacterium tuberculosis. **Molecular microbiology**, v. 29, n. 6, p. 1449–1458, 1998.

YUK, J.-M.; JO, E.-K. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. **Clinical and experimental vaccine research**, v. 3, n. 2, p. 155–167, 2014.

ZUÑIGA, J. et al. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 193923, 2012.