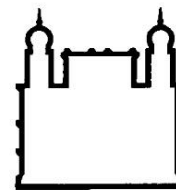




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**MORTE CELULAR E PERFIL DE LINFÓCITOS T NAS DIFERENTES FORMAS
CLÍNICAS DA TUBERCULOSE.**

CLARISSA CUNHA SANTANA

Salvador, Bahia

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-graduação em Patologia

**MORTE CELULAR E PERFIL DE LINFÓCITOS T NAS DIFERENTES FORMAS
CLÍNICAS DA TUBERCULOSE.**

CLARISSA CUNHA SANTANA

Orientadora: Prof^ª. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa

Tese de doutorado submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental para obtenção do título de doutor (a).

**Salvador, Bahia
2021**

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

Santana, Clarissa Cunha.

S232m Morte celular e perfil de linfócitos T nas diferentes formas clínicas da tuberculose.
/ Clarissa Cunha Santana. - 2021.
201 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^a. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa, Laboratório de Engenharia
Tecidual e Imunofarmacologia.

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto
Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. Tuberculose. 2. Coinfecção. 3. Morte celular. 4. HIV. I. Título.

CDU 616-002.5


"MORTE CELULAR E PERFIL DE LINFÓCITOS T NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA TUBERCULOSE".

Clarissa Cunha Santana

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 12 de novembro de 2021.

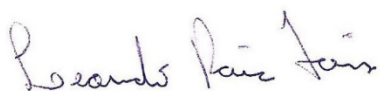
COMISSÃO EXAMINADORA



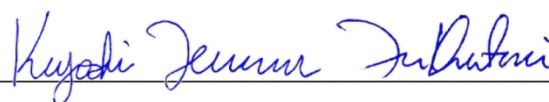
Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci
Professora
UFBA



Dra. Luana Leandro Gois
Professora
EBMSP



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Kiyoshi Ferreira Fukutani
Pós-Doc
IGM/FIOCRUZ



Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) -
Código de Financiamento 001

PPSUS - Programa Pesquisa Para o SUS

PROEX - PgPAT

Aos meus pais, Mariza e Carlos. Aos meus irmãos, Cleiton e Charles. À minha sobrinha linda Maria Vitória. Ao meu apoio de todas as horas, Otávio, e a todos os meus amigos que sempre me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus caminhos e colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

À minha família, pelo apoio e força em todos os momentos do desenvolvimento desta importante etapa da minha vida.

Agradeço a minha querida orientadora, Dra. Theolis, por ter aceitado me orientar e seguido comigo nessa empreitada.

A turma do Tbzando: Scarlet, Paula, Camila, sem as quais esse trabalho não seria possível.

Aos todos os meus amigos, em especial àqueles que me apoiaram nos momentos finais deste trabalho.

À secretaria do PgPAT, pela paciência, dedicação e eficiência.

À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna pelo auxílio na montagem da estratégia de pesquisa da revisão sistemática, pelas correções e orientações sobre o trabalho final.

À Universidade Federal da Bahia, por ter me proporcionado um ensino de qualidade.

À Capes pela concessão da bolsa, imprescindível para a realização deste trabalho.

SANTANA, Clarissa Cunha. Morte celular e perfil de linfócitos T nas diferentes formas clínicas da tuberculose. 2021. 216 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO. A tuberculose tem alta incidência e mortalidade em vários países, mesmo com vacina disponível. No seu espectro de apresentações observamos desde indivíduos infectados sem a doença, estado conhecido como tuberculose latente, àqueles com os casos mais graves, como os associados a infecções crônicas, cepas resistentes a múltiplas drogas empregadas no tratamento, ou coinfectados com HIV. Na tentativa de combate da doença, um arcabouço de fatores imunológicos está presente, porém, a micobactéria apresenta eficientes mecanismos de evasão da resposta imune, como a inibição da morte celular, a modulação da resposta de linfócitos e o escape para o ambiente extracelular. **MÉTODOS.** Nós avaliamos o papel de genes envolvidos em vias de morte celular e do perfil de linfócitos T indivíduos com diferentes formas da tuberculose, para identificar uma assinatura a nível transcricional e celular a ser utilizada como base para prospectar novos alvos para a distinção de indivíduos com tuberculose ativa e coinfectados TB-HIV. **RESULTADOS.** Nossos resultados apontam diferenças no padrão de ativação celular em LTBI, TB e TB-HIV, em parte determinadas pela tendência inversa da presença de células T HLA-DR+PD-1+ em relação às CD95+. Em TB-HIV observou-se maior presença de células de memória central e efetora, e células Tcm CD8+HLA-DR+ demonstraram serem capazes de discriminar os indivíduos coinfectados dos demais grupos clínicos investigados. Em coinfectados há expansão do compartimento de células T de memória central e em paralelo verifica-se que os genes AK5, FAS/CD95 e IL17A apresentaram capacidade de discriminar os grupos clínicos avaliados. Finalmente, obtivemos vários registros em bases de dados genéticos a respeito da variabilidade em moléculas de vias de morte celular que podem atuar como alvos promissores para intervenções futuras. **CONCLUSÕES.** AK5, FAS e IL-17A potenciais biomarcadores a serem explorados para a distinção dos grupos clínicos de interesse.

palavras-chave: Tuberculose, coinfecção TB-HIV, morte celular, perfil de linfócitos, genes diferencialmente expressos.

SANTANA, Clarissa Cunha. Cell death and T cell profile in different clinical forms of tuberculosis. 2021. 216 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Tuberculosis has a high incidence and mortality in several countries, even with a vaccine available. In its spectrum of presentations, we can see from infected individuals without the disease, a state known as latent tuberculosis, to those with the most severe cases, such as those associated with chronic infections, strains resistant to multiple drugs used in the treatment, or co-infected with HIV. In an attempt to fight the disease, a framework of immunological factors is present, however, the mycobacterium presents efficient mechanisms for evading the immune response, such as cell death inhibition, lymphocyte response modulation and escape to the extracellular environment. **METHODS.** We evaluated the role of genes involved in cell death pathways and the profile of T lymphocytes in individuals with different forms of tuberculosis, to identify a signature at the transcriptional and cellular level to be used as a basis for prospecting new targets for distinguishing individuals with tuberculosis active and co-infected TB-HIV. **RESULTS.** Our results point to differences in the pattern of cell activation in LTBI, TB and TB-HIV, in part determined by the inverse trend of the presence of HLA-DR+PD-1+ T cells in relation to CD95+. In TB-HIV, a greater presence of central and effector memory cells was observed, and Tcm CD8+HLA-DR+ cells demonstrated to be able to discriminate co-infected individuals from the other clinical groups investigated. In co-infected patients, there is expansion of the central memory T cell compartment and, in parallel, it is verified that the AK5, FAS/CD95 and IL17A genes were able to discriminate the evaluated clinical groups. Finally, we obtained several records in genetic databases regarding the variability in molecules of cell death pathways that could act as promising targets for future interventions. **CONCLUSIONS.** AK5, FAS and Il-17A potential biomarkers to be explored to distinguish clinical groups of interest.

Keywords: Tuberculosis, TB-HIV co-infection, cell death, lymphocyte profile, differentially expressed genes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

Ilustração - Figura 01. Forma de transmissão da Tuberculose	17
Ilustração - Figura 02. Granulomas na TB	19
Ilustração - Figura 03. Alguns mecanismos moleculares envolvidos na morte de macrófagos após a infecção pelo Mtb	24

Capítulo 1:

Diagrama - Figura 1. Número de genes triados de acordo com as vias de morte celular nas bases de dados utilizadas	45
Diagrama - Figura 2. Interseção entre os genes encontrados com anotações simultâneas para as vias de morte analisadas	47
Diagrama - Figura 3. Interseção dos anotados para a tuberculose e classificados pelas vias de morte celular	49
Gráfico - Figura 4. Classificação funcional dos 35 genes triados para as vias de morte celular e associados à tuberculose.....	51
Gráfico - Figura 5. 10 principais vias enriquecidas com os genes de morte celular associados à tuberculose	57
Gráfico - Figura 6. Associação entre os genes triados para as vias de morte e associados à tuberculose	58
Gráfico - Figura 7. Co-expressão entre os 35 genes listados para as vias de morte e associados à tuberculose	59

Capítulo 2:

Gráfico - Figure 1- Dynamics of CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T lymphocytes activation in Tuberculosis patients	130
Gráfico - Figure 2- Patterns of T lymphocyte activation.....	131
Gráfico - Figure 3- Memory compartments in T lymphocytes from Tuberculosis patients.....	133
Gráfico - Figure 4- The dynamics of activation in memory T cell populations	138

Gráfico - Figura 5 - Similaridades no perfil de expressão de moléculas de ativação e exaustão de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ em pacientes com tuberculose latente, tuberculose ativa e coinfectados com TB- HIV.....	140
Gráfico - Figure 6- Central memory HLA-DR+ CD8 T cells distinguishes patients ...	143
Gráfico - Supplementary Figure 1- Clinical Groups and endotype characteristics...	144
Gráfico - Supplementary Figure 2- Activation profile of T cells	145

Capítulo 3:

Gráfico - Figura 1 - Transcritos para compartimentos de linfócitos T em pacientes com LTBI, TB, HIV e TB-HIV	160
Gráfico - Figura 2 - Perfil transcricional relativo ao desenvolvimento, diferenciação e atividade de linfócitos em voluntários LTBI, TB, HIV e TB- HIV.....	163
Gráfico - Figura 3 - Avaliação da presença de transcritos de genes previamente associados à progressão da tuberculose nos grupos clínicos LTBI, TB, HIV e TB-HIV	165
Gráfico - Figura 4 - AK5 como possível biomarcador de infecção ativa por TB.....	167
Gráfico - Figura 5 - Genes como biomarcadores de distinção para entre tuberculose latente (LTBI), tuberculose ativa (TB), HIV e coinfeção TB-HIV	169

LISTA DE ABREVIATURAS

ATB	Tuberculose ativa
BAAR	Bacilos álcool ácido resistentes
BCG	Bacillus Calmette-Guérin Células
NK	Células natural killer
células Tregs	Células T regulatórias
CEP-CPqGM	Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
cols.	colaboradores
CTLs	células T citotóxicas
GDE	Genes diferencialmente expressos
GRZB	Granzima B
IGRA	Ensaio de Liberação de Interferon gamma
RNA	RNA mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
RefSNP	Referência SNP
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave – Corona Virus 2
SNPs	Polimorfismos de base única
Tcm	Células T de memória central
Tef	Células T efectoras
Tem	Células memória efectora Tn – Células T naive
Tscm	T stem cells

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 PANORÂMA EPIDEMIOLÓGICO DA TUBERCULOSE	14
2.2 FISIOLOGIA DA TUBERCULOSE	16
2.3 PAPEL DOS MACRÓFAGOS E DA MORTE CELULAR NA INFECÇÃO POR Mtb.....	20
2.4 FISIOPATOLOGIA DA COINFECÇÃO TB-HIV	24
2.5 LINFÓCITOS CD8 ⁺ EM TB E COINFECÇÃO TB-HIV	26
2.6 PAPEL DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA INFECÇÃO PELO Mtb	28
2.7 DIVERSIDADE GENÉTICA DA MICOBACTÉRIA	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVO GERAL	34
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
6 MATERIAIS E MÉTODOS	35
6.1 REVISÃO INTEGRATIVA	35
6.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO	35
6.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO	36
6.4 CÁLCULO AMOSTRAL	36
6.5 AVALIAÇÃO DE PERFIL DE MORTE CELULAR EM AMOSTRAS DE DOADORES VOLUNTÁRIOS COM LTBI, TB, HIV E TB-HIV	36
6.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO EM GENES DE MORTE CELULAR E RELACIONADOS À FUNÇÃO DE LINFÓCITOS	36
7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
7.1 ANÁLISES DE INTERAÇÃO E DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (GDES)	38
7.2ANÁLISE DOS RESULTADOS DE CITOMETRIA DE FLUXO	38
7.3ANÁLISE DOS RESULTADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA	39
8 RESULTADOS	40

8.1 CAPÍTULO 1

Revisão de literatura: Mapeamento de polimorfismos de base única (SNP) em genes de vias envolvidas na morte celular como ferramenta para a prospecção de possíveis alvos moleculares contra a tuberculose 40

8.2 CAPÍTULO 2

Dinâmica de ativação de linfócitos T em pacientes com Tuberculose Latente, Tuberculose Pulmonar Ativa e coinfectados TB-HIV 122

8.3 CAPÍTULO 3

Análise do perfil transcricional de genes associados ao desenvolvimento, diferenciação e função de linfócitos T em indivíduos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, na presença ou não de coinfecção com o vírus da imunodeficiência humana 154

9 DISCUSSÃO 177

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS 179

11 REFERÊNCIAS 180

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e afeta milhares de pessoas todos os anos, com elevada ocorrência de óbitos (OMS, 2021).

A TB apresenta espectros clínicos variados, que vão desde a infecção latente eficientemente controlada à forma ativa pulmonar (OMS, 2021; MONGA et al., 2017). Na infecção latente, os indivíduos infectados aparentemente possuem uma resposta imunológica mais eficiente, que contribui para a eliminação do bacilo ou sua contenção em estruturas denominadas granulomas. Parte destes indivíduos, por influência de fatores biológicos ou ambientais, podem evoluir para a reativação da doença, evento esperado para uma proporção de 5 a 10% dos infectados assintomáticos (OMS, 2021; GETAHUN et al., 2015).

Inúmeros trabalhos dedicam-se a buscar estratégias para o controle da disseminação da doença, entretanto várias são as limitações apresentadas pelos recursos disponíveis atualmente. Entre elas, podemos citar carência de métodos diagnósticos capazes de detectar os indivíduos assintomáticos e de abordagens terapêuticas preventivas à reativação do bacilo (HAAS; BELKNAP, 2019; CHEE et al., 2018). Ainda, a completa compreensão dos fenômenos que contribuem para a boa contenção do bacilo observada em grande parte destes indivíduos, poderia contribuir para o desenho de estratégias de prevenção.

No contexto da tuberculose, a coinfeção da TB com o vírus HIV é um dos fatores de risco para evolução da forma ativa da doença e para a grande ocorrência de óbitos (OMS, 2021). Na coinfeção, aparentemente, a micobactéria e o vírus agem de forma sinérgica, evitando os mecanismos imunológicos em resposta a ambos os patógenos (BELL; NOUSARDEGHI, 2018).

Fatores genéticos tanto do hospedeiro quanto da micobactéria são relacionados aos diferentes prognósticos durante a infecção (LIN et al., 2017). Variações genéticas dos hospedeiros, especialmente em vias envolvidas na resposta ao Mtb, podem favorecer ou proteger contra os casos graves, enquanto cepas mais virulentas do bacilo, apresentam diferentes mecanismos de evasão da resposta imune e persistência (DLAMINI et al., 2020).

Dentre os mecanismos de evasão, a micobactéria mostrou-se capaz de modular a expressão gênica do hospedeiro e, em última instância, isso reflete numa inibição dos mecanismos imunológicos efetores (FRAGA et al., 2018). Entre os genes

aparentemente modulados pelo bacilo, estão genes envolvidos em vias de morte celular das células infectadas e na ativação da resposta imune adaptativa. Nesse sentido, a possível existência de biomarcadores moleculares e celulares capazes de diagnosticar ou distinguir os diferentes quadros da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* tem sido alvo de investigações (MEHTO et al., 2015; RYNDAK et al., 2014; SELVARAJ, 2009;).

São vários os trabalhos que já demonstraram a possibilidade de se utilizar biomarcadores para a predição da doença (SILVEIRA-MATOS et al., 2021; TORNHEIM et al., 2020). A busca por novas alternativas para o diagnóstico é incentivada pela Organização Mundial da Saúde e outras agências. Essas estratégias fazem parte das metas de eliminação da tuberculose, que busca a redução dos casos mundiais até o ano de 2035 (OMS, 2015).

No nosso trabalho, objetivamos avaliar a presença de uma assinatura a nível transcricional e celular, com base na diversidade genética dos hospedeiros nas vias relacionadas à morte celular, na proporção de diferentes subconjuntos de linfócitos T e no perfil expressão gênica de linfócitos T em indivíduos em mono infecção com TB e HIV e coinfectados TB-HIV, para prospectar novos alvos para a distinção de indivíduos com tuberculose ativa e coinfectados TB-HIV.

Para isso, avaliamos em amostras de pacientes com tuberculose latente, tuberculose ativa, HIV e TB-HIV a presença de expressão diferencial de genes envolvidos na ativação de linfócitos. Amostras destes mesmos voluntários foram avaliadas quanto à dinâmica de ativação, exaustão e diferenciação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, com o objetivo de comparar os perfis celulares nesses diferentes grupos clínicos. Por fim, nós realizamos uma revisão sistemática de literatura de polimorfismos genéticos em genes relacionados à morte celular. Todas as abordagens estudadas indicam potenciais biomarcadores a serem explorados para a distinção dos grupos clínicos de interesse, além de merecerem maior investigação como possíveis alvos de intervenção no contexto da tuberculose.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. PANORÂMIA EPIDEMIOLÓGICO DA TUBERCULOSE

Após quase 100 anos do início da utilização da BCG (*Bacillus Calmette–Guérin*) contra a tuberculose (TB) (FATIMA et al., 2020) a doença permanece como um grande

problema de saúde. A doença, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), está entre as que mais matam mundialmente, perdendo o primeiro lugar entre as doenças infecciosas que mais levam à óbito somente com a chegada da pandemia causada pelo SARS-CoV-2, no início de 2020 (OMS, 2021)

A TB apresenta um largo espectro de apresentações clínicas que estão relacionadas tanto a fatores biológicos do hospedeiro e da micobactéria quanto a fatores ambientais e sociais e da presença de comorbidades (OMS, 2021; MONGA et al., 2017; LODDENKEMPER; LIPMAN; ZUMLA, 2016; ROWIŃSKA-ZAKRZEWSKA et al., 2016).

Levantamentos recentes da Organização Mundial da Saúde estimam que 10 milhões de pessoas foram diagnosticadas com TB em 2018, com aproximadamente 1 milhão e meio de mortes. Desse total de óbitos, 250.000 foram de indivíduos coinfectados com TB-HIV. Entretanto, ainda conforme estes dados, embora tenha ocorrido uma estabilização da incidência e do número de óbitos anuais da doença nas últimas décadas, a TB ainda afeta 202 países e 30 deles são responsáveis por 90% de todos os casos. Os impactos são observados principalmente em populações economicamente vulneráveis (OMS, 2019). É importante considerar ainda que, estes dados se referem majoritariamente à parcela da população afetada com a forma ativa da doença, uma vez que apenas pequena porção de casos assintomáticos são detectados eventualmente pelo teste cutâneo e ensaio de liberação de interferon-gamma (IGRA) (DOMÍNGUEZ; LATORRE; SANTIN, 2017; ZHANG et al., 2016). Esse cenário contribui para uma subestimação dos números reais de infectados anualmente.

Apesar de epidemiologicamente importante, a BCG é a única vacina aprovada para a prevenção da doença. Essa vacina é baseada numa forma atenuada de *Mycobacterium bovis*, e estudos demonstram que a BCG apresenta eficácia variável contra a forma pulmonar, com perda progressiva de potencial protetivo em indivíduos imunizados já bem documentada (BOMAN, 2016; MANGTANI et al., 2013; TEO e SHINGADIA, 2005; STERNE; RODRIGUES e GUEDES, 1998). As perdas variáveis na eficiência da vacina, principalmente em adultos, bem como de potencial protetivo após 10 anos da vacinação, podem estar relacionadas a mecanismos imunológicos específicos na resposta contra o Mtb, dentre elas os mecanismos de ativação celular (RAI et al., 2018), além de fatores genéticos tanto dos hospedeiros quanto da micobactéria.

2.2. FISILOGIA DA TUBERCULOSE

A infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre principalmente por via aérea superior após os bacilos serem liberados em gotículas e aerossóis provenientes de indivíduos infectados sintomáticos. Uma vez nos pulmões, sua proliferação poderá ocasionar a manifestação clássica da doença, a forma ativa pulmonar (ATB) (**figura 01**). A grande maioria dos indivíduos que entram em contato com o bacilo desenvolve uma eficiente resposta imunológica, que promove a eliminação ou contenção do Mtb e, conseqüentemente, a inibe a manifestação sintomática da doença (CADENA; FORTUNE e FLYNN, 2017). Tais indivíduos apresentam a tuberculose latente assintomática (LTBI) que acomete entre um quarto a um terço da população mundial. A depender de fatores associados tanto ao indivíduo quanto à micobactéria, esses indivíduos podem evoluir para a forma ativa, fato observado entre 5 e 10 % dos indivíduos com LTBI (OMS, 2019; CADENA; FORTUNE e FLYNN, 2017; LIN e FLYN, 2015).

Embora a seja consenso para muitos autores a descrição da doença nestas duas formas clínicas, trabalhos demonstram que há um espectro de apresentações entre a ATB e LTBI, que compreende os casos de esterilização completa da infecção, assim como casos em que a micobactéria permanece viável nas estruturas de contenção imunológica localizadas no pulmão (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017; O'GARRA et al., 2013). A esta variabilidade de apresentações nos indivíduos infectados é atribuída grande parte da dificuldade de se manejar os casos de LTBI e de se compreender as variáveis imunológicas que estão envolvidas em uma ou outra forma de apresentação.

A tuberculose pode ainda afetar outros órgãos e tecidos, sendo então caracterizada como tuberculose extrapulmonar, que muitas vezes é resultado de infecção primária nestes locais ou por disseminação da doença pulmonar (SANCHES; CARVALHO; DUARTE, 2015; GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2011; LIN et al., 2009; PETO et al., 2009).

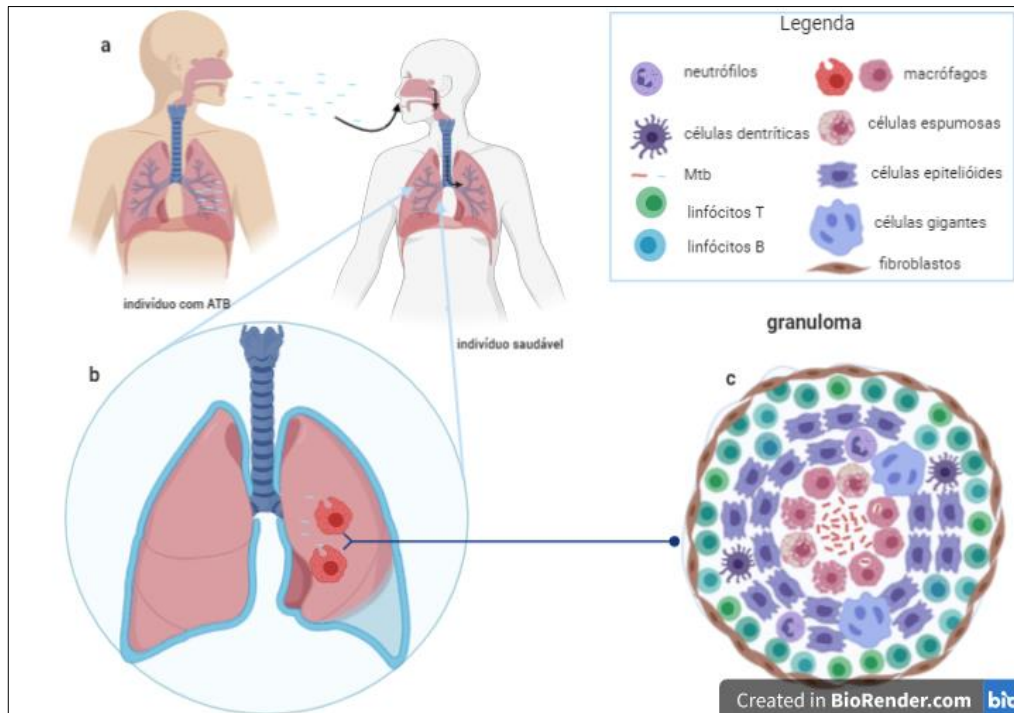


Figura 01. Forma de transmissão da Tuberculose. a) Transmissão de um indivíduo com apresentação sintomática da doença pulmonar (ATB) para um indivíduo saudável. **b)** Uma vez no pulmão, os macrófagos são as primeiras células imunológicas a entrarem em contato com o bacilo; **c)** a partir da ação dos macrófagos outras células imunológicas são recrutadas e inicia-se a formação do granuloma. Criação da autora com auxílio da ferramenta BioRender.com.

Na tuberculose pulmonar, estrutura responsável pela contenção e controle da micobactéria é o granuloma (RAMAKRISHNAN, 2012; TSAI et al., 2006; COSMA; SHERMAN; RAMAKRISHNAN, 2003).

O granuloma é estruturado por um arranjo de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos, células NK, fibroblastos e células epiteliais que formam um intrincado complexo de células que mantêm as micobactérias em seu interior evitando sua disseminação para outras áreas em indivíduos assintomáticos (MARTINO et al., 2019; RAO et al., 2019; GUIRADO et al., 2015; RAMAKRISHNAN, 2012). A formação do granuloma se inicia após os primeiros macrófagos alveolares entrarem em contato com os bacilos que chegam ao pulmão. Estes macrófagos, uma vez ativados, secretam citocinas e quimioatratantes que recrutam células para o sítio de infecção e, juntamente com células dendríticas, são responsáveis por apresentá-los aos linfócitos (BHAVANAM et al., 2016; DORHOI e KAUFMANN, 2015; ORME e BASARABA, 2014), atuando como um elo entre a resposta imune inata e a adaptativa (**figuras 01 e 02**).

Dentre as citocinas relacionadas à indução da formação e manutenção do granuloma, o TNF- α e IFN- γ são mencionadas como principais (DORHOI e KAUFMANN, 2015; ETNA et al., 2014; SHARMA et al., 2007). Os níveis de TNF- α e IFN- γ são associados não só a capacidade de formação dos granulomas, mas também à sua quantidade, podendo ser considerados preditores da sua ocorrência (AGRAWAL et al., 2016).

A estruturação e manutenção do granuloma depende, entre outros fatores, do equilíbrio entre mediadores imunológicos pro- e anti-inflamatórios (CICCHESE et al., 2018; VYAS e GASWAMI, 2017). A perda deste balanço, principalmente com uma sobrecarga e persistência de estímulos pro-inflamatórios, pode favorecer a progressão da doença (CICCHESE et al., 2018; SILVA et al., 2018; GIDEON et al., 2018; CILFONE et al., 2013).

O centro destes granulomas é rico em moléculas pro-inflamatórias como eicosanoides, espécies reativas e peptídeos com atividade antimicrobiana (MARAKALALA et al., 2016), que atuam no controle da replicação do Mtb. Entretanto, a presença de células e moléculas regulatórias se faz importante no curso da infecção, pois, em caso de cronificação da inflamação, o dano tecidual pode levar a um prejuízo no hospedeiro e beneficiar a proliferação bacteriana (CICCHESE et al., 2018).

Estudos recentes têm demonstrado que, considerando o papel de moléculas regulatórias na manutenção do balanço imunológico, a micobactéria se utilizaria de mecanismos para a subversão das vias regulatórias e assim promoveria a exacerbação da inflamação como meio de favorecer a sua disseminação (BRACE et al., 2017). Contudo, a presença precoce de moléculas regulatórias como IL-10, IL-4, células T_{regs} e as recentes identificadas células B regulatórias, é indicativa de falha na resposta frente ao bacilo, contribuindo para a evolução ativa da doença (LOXTON, 2019; WONG et al., 2019; DAY et al., 2019; PATHAKUMARI; DEVASUNDARAM; RAJA, 2018) (**figura 02**).

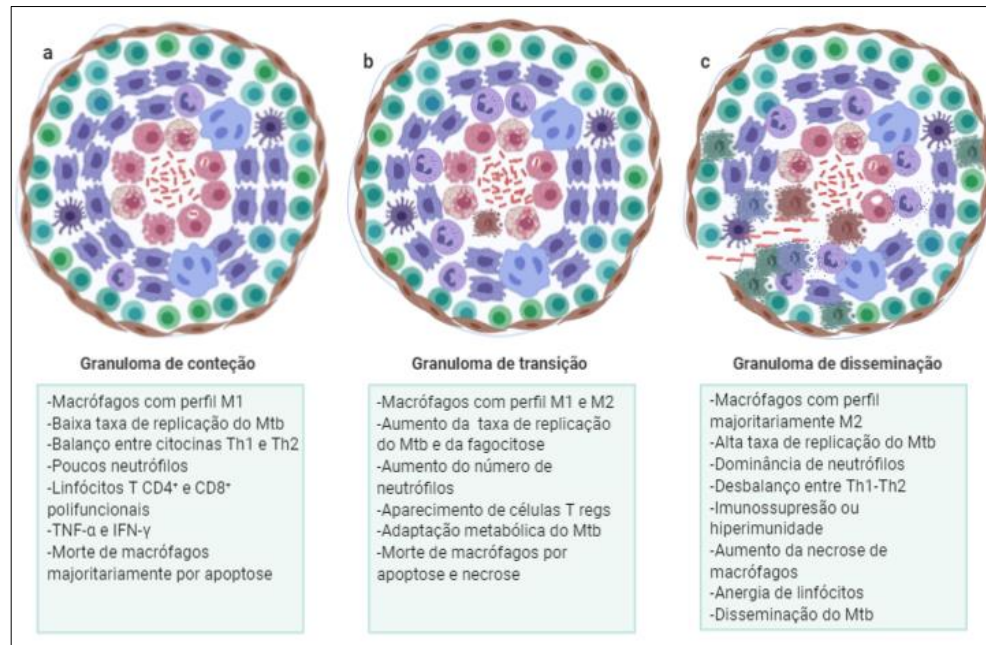


Figura 02. Granulomas na TB. **a)** granuloma de contenção – ocorre a contenção ou a esterilização da infecção; **b)** granuloma de transição – ocorre uma mudança na organização do granuloma e um aumento da taxa de replicação do bacilo, mas ainda mantém-se íntegro e serve de nicho para a micobactéria que consegue se adaptar às suas condições; **c)** granuloma de disseminação – Há uma total desestruturação do granuloma, associado a alta taxa de replicação do bacilo, culminando com o rompimento da estrutura. Criação da autora através da ferramenta BioRender.com.

Em granulomas ineficientes no controle da infecção, um alto infiltrado de neutrófilos (KROON et al., 2018; LYADOVA, 2017), presença de macrófagos com fenótipo anti-inflamatório (KHAN et al., 2019; HUANG et al., 2019; HUANG et al., 2015) e a presença de caseação (CILFONE et al., 2015; KIM et al., 2010) são alguns dos achados. Em indivíduos coinfectados com HIV⁺ a atuação conjunta do vírus e do bacilo contribuem para uma ativação ineficaz das células que compõem a estrutura, pela inibição da atividade microbicida ou mesmo a lise constante destas (DRIERICH et al., 2016).

É vasta a literatura que demonstra a heterogeneidade de formação dos granulomas entre os indivíduos infectados, assim como da sua capacidade de conter os bacilos (CADENA; FLYN; FORTUNE, 2017; LENAERTS; BARRY-III; DARTOIS, 2015). Em granulomas eficientes no controle da tuberculose pode ser observado desde a esterilização completa da infecção até a contenção da disseminação da bactéria para tecidos adjacentes, contudo, o Mtb se mantém viável no centro destas estruturas (PIENAR et al., 2016; KAPOOR et al., 2013; LIN et al., 2014). Para ambos

os casos, evidências foram obtidas há mais de 5 décadas em análises de granulomas *post mortem* de falecidos por TB ou outras causas.

O crescimento de micobactérias obtidas de granulomas excisados em meio de cultivo foi comprovado, demonstrando que as bactérias podem se manter viáveis e com capacidade replicativa por longos períodos dentro desta estrutura (O’GARRA et al., 2013; MEDLAR, 1948). Outros estudos com modelos animais como do peixe-zebra, camundongos e porcos confirmam estes achados (PALMER, 2018; KRAMNIK e BEAMER, 2016; LY; RUSSEL; McMYRRAY, 2008; VIA et al., 2008). Estudos mais recentes utilizando modelos computacionais e *in vitro*, reproduzem alguns dos resultados encontrados anteriormente, além de permitir novas avaliações para elucidação dos processos cronológicos envolvendo a formação do granuloma e a progressão à ATB (ELKINGTON et al., 2019; DATTA et al., 2016; REYES et al., 2015).

Percebe-se então que a relação da micobactéria com as células e estruturas envolvidas na resposta imunológica do hospedeiro é bastante complexa. A elucidação dos mecanismos de interação celular durante as diferentes apresentações da infecção mostra-se de vital importância para criação estratégias de combate à doença.

2.3. PAPEL DOS MACRÓFAGOS E DA MORTE CELULAR NA INFECÇÃO POR Mtb.

Os macrófagos apresentam dualidade em relação ao Mtb. Além de serem responsáveis pela contenção inicial do bacilo, podem servir como nicho de multiplicação e persistência da micobactéria (GROVER et al., 2018; MISHRA e SUROLIA, 2018). Diferentes linhagens de macrófagos (*e.g.* alveolares e intersticiais) apresentam perfis distintos de resposta frente ao Mtb, com ambientes mais restritivos ou permissivos ao crescimento do bacilo (HUANG et al., 2018).

No contexto imunológico da TB, em especial na gênese do granuloma, os macrófagos apresentam notável protagonismo. Além de serem as primeiras células a entrarem em contato com o bacilo e representarem o estímulo inicial para a formação desta estrutura, podem se apresentar com novas configurações celulares importantes tanto para a manutenção do granuloma, quanto para progressão da infecção. Entre estas novas configurações estão as células gigantes, epitelióides e espumosas (BUSSI e GUTIERREZ, 2019; RAMAKRISHNANN, 2012)

Os macrófagos alveolares recrutados ao sítio de inicial de infecção são responsáveis por conter as micobactérias através da fagocitose. Estes macrófagos

migram para o parênquima pulmonar e, uma vez ativados, são responsáveis pela liberação de diversos mediadores inflamatórios que recrutam outras células para o local da infecção. Essas células circulantes ajudarão a estruturar o granuloma (BUSSI e GUTIERREZ, 2019), além de realizarem a apresentação de antígenos à linfócitos recrutados (GRACE e ERNST, 2016).

Frequentemente os granulomas se tornam caseosos em sua porção central, caracterizada pela morte de células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, se tornando um ambiente favorável à multiplicação da bactéria (SARATHY e DARTOIS, 2020; KIM et al., 2010). Os macrófagos presentes na porção caseosa dos granulomas são em sua maioria macrófagos espumosos, células com acúmulo de lipídeos intracelular induzido por mecanismos de sobrevivência da micobactéria, uma vez que contribuem para o seu metabolismo no ambiente hipóxico do granuloma (SARATHY e DARTOIS, 2020; CUMMING et al., 2018; QUALLS e MURRAY, 2015; KIM et al., 2010). Essas células espumosas também contribuem para o fenótipo de dormência do Mtb observado em infecções latentes (DANIEL et al., 2011).

Os macrófagos apresentam basicamente dois perfis de polarização durante processos infecciosos. O perfil M1 é associado a atividade pró-inflamatória durante a infecção pelo Mtb e caracterizado pela liberação de TNF- α , IL-2, IFN- γ e produção de NO, importantes no controle do bacilo. O perfil M2 está associado com atividade anti-inflamatória que é deletéria ao hospedeiro nos momentos iniciais da infecção (HUANG; NAZAROVA; RUSSELL, 2019; REFAI et al., 2018; SHEN et al., 2017) por não ser sustentado e sustentar uma resposta eficiente.

Diversos trabalhos relatam a capacidade do Mtb em subverter a atividade micobactericida dos macrófagos, ao impedir a formação do fagolisossomo, tornando o interior da célula um nicho para sua sobrevivência, onde podem manter-se parcialmente invisíveis à ação de outras células imunológicas (UFIMTSEVA et al., 2018; UPADHYAY; MITTAL; PHILIPS, 2018). Outros trabalhos mostram ainda a capacidade de cepas de Mtb em evadir do fagossomo e migrar para o citoplasma da célula (SIMEONE et al., 2016; CAMBIER; FALKOW; RAMAKRISHNAN, 2014) ou ainda modular o perfil dos macrófagos infectados para o perfil M2 e, portanto, garantir a ineficiência destas células na resposta à infecção (AHLUWALIA et al., 2017).

O Mtb também já se mostrou capaz de, através da exportação de peptídeos ao citoplasma celular, recrutar precocemente macrófagos ao sítio de infecção e durante a dinâmica de infecção e migração constante destas células aumentar sua taxa de

replicação e a indução da formação de granulomas secundários (DAVIS e RAMAKRISHNAN, 2009).

Outro aspecto que ganha destaque nos estudos abrangendo a atuação dos macrófagos frente à micobactéria é o papel do desfecho destas células, uma vez infectadas, na ativação de vias importantes imunologicamente para o hospedeiro (UPADHYAY; MITTAL e PHILIPS, 2018). É sabido que a morte dos macrófagos infectados pode favorecer tanto a contenção do bacilo, como a disseminação da doença (MOHAREER; ASALLA e BANERJEE, 2018; MAHAMED et al., 2017).

Inúmeros trabalhos e revisões buscam avaliar a importância da morte de macrófagos infectados pelo bacilo no contexto da TB. Outros tentam elucidar os mecanismos pelos quais a micobactéria consegue ativar ou inibir determinadas vias de morte celular visando sua sobrevivência (PAJUELO et al., 2018; MAHAMED et al., 2017; MORACO e KORNF, 2014). Várias são as contribuições sobre o tema, mas há pouco consenso a respeito de quais fatores são determinantes para ativação de uma ou outra via. Sabe-se, entretanto, que a virulência da micobactéria, receptores envolvidos no reconhecimento, bem como moléculas transportadas pela micobactéria ao citoplasma da célula são fatores que podem favorecer ou inibir uma via (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016).

Durante muito tempo acreditou-se estar bem estabelecido papel das mortes por apoptose e necrose em macrófagos no desfecho da infecção pelo *M. tuberculosis*. Conforme pressupostos, a apoptose configura uma morte protetora ao hospedeiro, pois através dela o Mtb permaneceria contido nos corpos apoptóticos que então seria fagocitado por novas células direcionadas ao local. Este processo, denominado eferocitose, impediria a liberação das micobactérias no meio extracelular o que, portanto, traria prejuízo à sua sobrevivência (BEHAR e BRIKEN, 2019). Na mesma linha de pensamento, na necrose, um tipo de morte onde há rompimento de membrana e extravasamento de conteúdo citoplasmático, o bacilo conseguiria alcançar a luz extracelular e se disseminar para outras áreas do pulmão (GROVER et al., 2018). Todavia, já foi demonstrado que o Mtb pode se valer da eferocitose para disseminar à novos macrófagos, que rapidamente tornam-se infectados após o processo (HOSSEINI et al., 2016). Esse mecanismo seria utilizado pela bactéria para migrar às regiões mais periféricas do granuloma e, eventualmente evadir desta estrutura (GROVER et al., 2018; AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016; HOSSEINI et al., 2016).

De fato, a apoptose de macrófagos está associada com a redução da viabilidade de Mtb e possui uma relação importante com a ativação de linfócitos T, principalmente em estágio agudo da doença (GROVER et al., 2018). A inibição da apoptose com indução à necrose de macrófagos contribui para o estabelecimento da tuberculose (SU et al., 2016; DIVANGAHI; BEHAR e REMOLD, 2013). É sabido ainda que cepas mais virulentas possuem mecanismos para inibir a apoptose de macrófagos ao passo que induzem a necrose nestas células (DENG et al., 2019; ARNETT et al., 2018; SU et al., 2016; CHEN; GAN e REMOLD, 2006).

Mecanismos que levam a ativação da apoptose em macrófagos durante a infecção pelo *Mycobacterium* sp. já foram descritos. Dentre eles estão via TNF/TNFR, receptores Toll-like, especialmente TLR 2 e 4 (LIN et al., 2019; GROVER et al., 2018; WANG et al., 2017), via ligação Fas/FasL, alteração da expressão de Bax/Bcl-xL (LI et al., 2016; AGUILÓ et al., 2014) e estresse no retículo endoplasmático (GROVER et al., 2018; LIM et al., 2014).

A partir das descobertas de novos mecanismos moleculares envolvidos, outros tipos de morte foram relacionados com a infecção pelo *M. tuberculosis* (GONG et al., 2019; JÚAREZ-ORTEGA et al., 2018; PARANDHAMAN e NARAYANAN, 2014; BRIKEN, 2013). Além da apoptose e necrose (não regulada), autofagia, necroptose, NETose, fereroptose, piroptose e pironecrose são alguns processos de morte que foram estudados na TB (AMARAL., 2019; MOHAREER, ASALLA e BANERJEE, 2018; ADAM et al., 2017; ZHOU et al., 2016; BRIKEN, 2013).

A figura 03 sumariza alguns mecanismos moleculares envolvidos na apoptose e na necrose regulada desencadeados durante a infecção de macrófagos pelo Mtb.

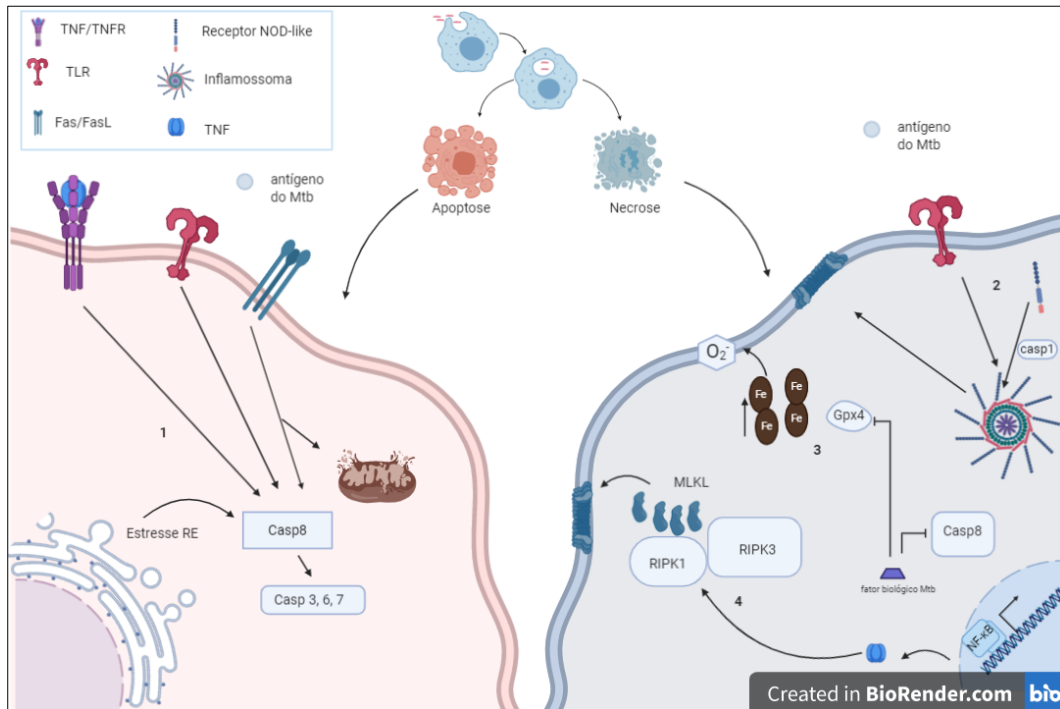


Figura 03. Alguns mecanismos moleculares envolvidos na morte de macrófagos após a infecção pelo Mtb. 1) apoptose – esta via pode ser desencadeada por receptores TNFR, TLR, FAS e seus ligantes, bem como pelo estresse do RE promovido pela micobactéria. Estes eventos desencadeiam vias que levarão à ativação de caspases envolvidas na apoptose; **2) piroptose e pironecrose** – ambas as vias apresentam mecanismos de ativação parecidos, iniciadas por receptores TLR ou NOD-like, e levam à ativação de um complexo inflamossoma, que viabiliza a formação de poros na membrana da célula infectada levando-a à morte. Contudo diferem na necessidade da atuação de Caspase 1, essencial para a piroptose, enquanto a pironecrose é dependente de Catepsina B; **3) ferroptose** – Fatores biológicos do Mtb, promovem a inibição de Caspase 8 e de Glutathione redutase e peroxidase o que, juntamente ao acúmulo intracelular de ferro, estimula o aumento de espécies reativas como íons superóxido que reagem com membranas celulares; **4) necroptose** – esta via inicia-se com receptores TNFR1 e ocorre com a inibição de Caspase 8. Há a formação de um complexo necrossoma, formado por RIPK1 e RIPK3 que recrutam MLKL que ao translocar para a membrana da célula formam poros que levam à morte celular. Criação da autora com auxílio da ferramenta BioRender.com.

2.4. FISIOPATOLOGIA DA COINFECÇÃO TB-HIV

A coinfeção com o vírus HIV (TB-HIV) é um dos principais fatores de agravamento do quadro da TB, aumentando o risco de evolução para doença ativa e o risco de óbito. São vários fatores que podem contribuir para o aumento do risco de tuberculose ativa entre os indivíduos infectados pelo HIV, entre os quais se destacam a falha do sistema imune inato e a depleção/disfunção das células T CD4⁺, que resultam em maior risco de transição da infecção tuberculosa latente para a forma ativa da doença (AHMED; RAKSHIT e VYAKARNAM, 2016). Em indivíduos

coinfectedados com HIV, os granulomas apresentam aumento da bacilaridade e diminuição de células CD4⁺ periféricas, assim como diminuição da contagem de CD4⁺ e CD8⁺ e da secreção de IFN- γ e TNF, bem como aumento do número de neutrófilos e secreção de IL-10 (DRIEDRICH et al., 2016).

Avaliações anteriores demonstraram que a coinfeção TB-HIV contribui para a pior progressão mesmo em casos em que a contagem de CD4 mantém-se preservada (BELL e NOURSADEGHI, 2018; SONNENBERG et al., 2005), sugerindo que não somente o decréscimo no número, mas também a funcionalidade das células possa interferir na reativação da TB. A progressão da TB em pessoas coinfectadas com o vírus está associada a anergia ao teste tuberculínico e o dano tecidual para contenção da micobactéria pode estar associado à maior frequência de formas extrapulmonares da TB em indivíduos coinfectados (LAWN; BUTERA; SHINNICK, 2002).

Na coinfeção tuberculose e HIV, o *Mycobacterium tuberculosis* e o vírus da imunodeficiência humana agem sinergicamente, levando à diminuição da capacidade do sistema imune de eliminar ambos os patógenos, ao interferir no recrutamento e função de macrófagos e linfócitos T. Isso implica na diminuição da morte intracelular do bacilo, do processamento de antígenos, da ativação e proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além da falha na produção de citocinas importantes para induzir a atividade bactericida dos macrófagos (IFN- γ) e a apoptose (TNF) (PATEL et al., 2007).

Já está bem estabelecido o papel do TNF na indução da apoptose na TB e na infecção pelo HIV. A apoptose induzida por patógeno, por fármacos ou por linfócitos T citotóxicos diminui a viabilidade do *M. tuberculosis* e interfere na taxa de replicação do HIV (METHO et al., 2015; ABBAS et al., 2014; PANDO; OROZCO; AGUILAR, 2009). Tanto na infecção pelo HIV quanto pelo Mtb os níveis de citocinas inflamatórias como TNF são mais elevados no estágio agudo da doença. Essas citocinas estão envolvidas na ativação dos macrófagos infectados, na indução da maturação do fagossomo, produção de moléculas antimicrobianas como intermediários reativos do nitrogênio (RNI) e intermediários reativos do oxigênio (ROI) para eliminação do bacilo e na indução da apoptose das células infectadas (KAUFMAN, 2001).

Os macrófagos estão envolvidos na patogênese tanto da TB quanto do HIV e servem de reservatório para ambos os agentes (XU et al., 2014; MARIANI et al., 2001). A infecção dos macrófagos alveolares pelo vírus não resulta em morte celular como nas células T CD4⁺, mas em persistência da infecção que pode levar a uma disfunção de outros componentes de defesa do hospedeiro como a fagocitose mediada por

receptor, ativação dos receptores tipo Toll (TLR4) e sinalização do fator nuclear-kappa B (NF- κ B) (CAIN *et al.*, 2009; GOUGEON; MONTAGNIER, 1999).

Patel e colaboradores (2007) avaliaram a apoptose de macrófagos infectados com a cepa virulenta do *M. tuberculosis* H37Rv de indivíduos HIV positivos assintomáticos e indivíduos saudáveis. Eles observaram que a apoptose dos macrófagos dos indivíduos infectados com HIV foi reduzida em resposta à cepa H37Rv e a diminuição da apoptose estava associada à inibição da secreção de TNF. Em trabalho anterior do nosso laboratório, Noronha e colaboradores (2008) demonstraram produção diminuída de TNF nos granulomas pulmonares de pacientes coinfectados com TB-HIV.

O decréscimo dos níveis destas citocinas inflamatórias em ambas as infecções está marcado pelo aumento da secreção de citocinas regulatórias como o IL-10 que, no caso do HIV, aumenta a expressão dos correceptores CXCR4 e CCR5 nos macrófagos, facilitando a entrada do vírus. A IL-10 também induz a liberação de TNFR2, que tem efeito anti-apoptótico e reduz a secreção de IL-12 pelos macrófagos infectados pelo bacilo, resultando na diminuição da ativação das células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e prejudicando o desenvolvimento da resposta imune protetora (FLYNN; CHAN, 2001). Consonante a estas evidências, uma ausência de infecção ativa pelo bacilo em pacientes HIV-positivos foi relacionada com uma resposta Mtb-específica detectável de células sobretudo de T CD4⁺, mas também de CD8⁺ (DAY *et al.*, 2008). Entretanto, inúmeros trabalhos demonstram que, mesmo nos momentos iniciais da coinfeção TB-HIV, onde a população de linfócitos T CD4⁺ ainda está preservada, a infecção pelo HIV aumenta até 5 vezes a chance de apresentação ativa da TB em relação àqueles HIV⁻ (BELL e NOURSADEGHI, 2018).

As evidências reunidas até aqui apontam que vários mecanismos estão envolvidos na determinação do maior risco de evolução para a forma ativa em indivíduos TB-HIV, que não somente àqueles envolvendo a contagem de linfócitos. Ainda, pouco está esclarecido sobre como ocorre a modulação da resposta do hospedeiro frente ao Mtb e o HIV simultaneamente, bem como a definição do papel das diferentes populações celulares, especialmente as envolvidas na resposta imune adquirida, na proteção conferida a esses indivíduos.

2.5. LINFÓCITOS CD8⁺ EM TB E COINFECÇÃO TB-HIV

Embora muito sobre o papel dos linfócitos T CD4⁺ (T_{helper}) na TB e na infecção pelo HIV seja documentado, pouco se elucidou sobre atuação dos CD8⁺ no contexto das doenças (SHAO et al., 2016; JASENOSKY et al., 2015; LIN e FLYNN; 2015). Sabe-se, porém, que estes linfócitos são capazes de reconhecer tanto células infectadas, como micobactérias livres, embora este último cenário seja menos frequente (PREZZEMOLO et al., 2014). Embora evidências apontem que estas células sozinhas não são capazes de controlar a infecção, sua presença é requerida para uma boa proteção ao hospedeiro (PREZZEMOLO et al., 2014; CHEN et al., 2009; WOODWORTH e BEHAR, 2006). Em contrapartida, estas células são associadas a uma proteção mais duradoura e efetiva e têm sido investigadas quanto ao seu potencial de ação para o desenho de estratégias vacinais (RAI et al., 2018, CHEN et al., 2009).

Os linfócitos CD8⁺ reconhecem antígenos bacterianos exclusivamente por meio de MHC-I e a isto pode estar relacionado o fato de serem mais frequentemente estimulados por antígenos secretados ao citoplasma das células infectadas (PREZZEMOLO et al., 2018; HARRIFF, PURDY e LEWINSOHN, 2012). Ainda, sua atividade está diretamente relacionada à atividade das células CD4⁺, onde a deficiência delas leva a uma menor ativação e sustentação da atividade efetora dos CTLs (YAO et al., 2014; WOODWORTH e BEHAR, 2006). A destruição dos linfócitos T CD4⁺ é um dos fatores que prejudica a diferenciação das células T CD8⁺ em linfócitos T citotóxicos (CTL) capazes de eliminar os macrófagos infectados. A falha da resposta de CTL é usada como um mecanismo de evasão pelos patógenos para evitar a morte das células infectadas e alguns estudos têm demonstrado que a maturação e ativação das CTLs são fundamentais na eliminação tanto de células infectadas com *M. tuberculosis* como também pelo HIV (SHAO et al., 2016; NDHLOVU et al., 2015).

Addo e cols (2007) demonstraram que em pacientes com TB há uma diminuição de células T CD8⁺ diferenciadas produtoras de IFN- γ e granzima e que a resposta é restaurada após a quimioterapia. Divangahi e colaboradores (2010) também demonstraram que a inibição da apoptose pela micobactéria tem efeito na capacidade de indução da resposta de células T CD8⁺, o que tem como resultado a diminuição do controle do bacilo.

Brighenti e Andersson (2010) utilizaram amostras de tecido e análises de imagens computadorizadas *in situ* para descrever as infecções primária e crônica em

pacientes com HIV, e observaram a falta da expressão de perforina nas células T CD8⁺ efectoras HIV-específicas. Rodrigues e cols. (2003) avaliaram a contagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ efectoras e de memória em indivíduos coinfetados (TB-HIV) e monoinfetados (TB ou HIV) e observaram que os pacientes coinfetados têm menos células efectoras e de memória comparados aos indivíduos com apenas uma das infecções. Proporções diminuídas de células T CD8⁺ no sangue foram associadas a maior extensão de doença em pacientes com TB (MORAIS-PAPINI et al., 2017; SUAREZ et al., 2015; GUGLIELMETTI et al., 2013).

Assim, mesmo sabendo que os linfócitos CD8⁺ desempenham papel importante tanto em doenças virais quanto na TB, pouco se sabe a respeito do perfil de diferenciação destas células e sua atuação frente à tuberculose. Se faz necessário, portanto, compreender o contexto da atividade deste linfócito em casos de monoinfecção e coinfeção de forma que estes conhecimentos possam contribuir para uma abordagem mais eficaz no manejo destes pacientes, assim como para os desenhos de novas estratégias vacinais.

2.6. PAPEL DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA INFECÇÃO PELO Mtb

A busca por uma possível influência de aspectos genéticos dos hospedeiros que contribuem para a persistência da tuberculose tem sido objetivo de dezenas de trabalhos nos últimos anos (MANSOURI; HEYDARZADEH e YOUSEFI, 2018; ZHAO; WEN e LI, 2016). Dentre eles, a relação entre a ocorrência de polimorfismos de base única (SNPs) em genes de receptores e citocinas envolvidas na resposta imune inata e em mecanismos de morte celular e a susceptibilidade do hospedeiro à tuberculose ativa e à coinfeção com HIV têm sido cada vez mais investigadas (BEIRANVANDA et al., 2016; ARAÚJO et al., 2013; FOX et al., 2013; NASI et al., 2013).

IL-1B, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , P2X7R, são algumas das moléculas avaliadas (TAHERI et al., 2019; WU et al., 2018; JOSHI et al., 2017; SHAMSI et al., 2016). SNPs nessas moléculas podem se apresentar tanto como fatores protetivos em relação à apresentações mais graves da doença, quanto ao aumento de risco para a forma ativa da infecção, para doença extrapulmonar, bem como para mortalidade em decorrência da TB (CHANG et al., 2018; HONG et al., 2017; TONG et al., 2017).

Varahram e colaboradores (2014) demonstraram haver relação entre a ocorrência de polimorfismos na região promotora do TNF e a susceptibilidade à TB em

iranianos, porém não foi encontrada nenhuma relação significativa entre as frequências de SNPs no hospedeiro e a variabilidade genética de isolados de *Mtb*. Nasi e colaboradores (2013) investigaram a associação de 20 polimorfismos em 15 genes, dentre os quais genes envolvidos em apoptose, com a não progressão da infecção pelo HIV-1. Os resultados encontrados indicam que os alelos *TNF-238A* e *PDCD1-7209T*, estão associados positiva e negativamente, respectivamente, com a forma não progressiva da infecção (em comparação com indivíduos com progressão típica).

Em trabalho mais recente, Wu e colaboradores (2018) demonstraram haver correlação entre polimorfismos em *IL-1B* e *LTBI*, enquanto *IL-6* e *TNF- α* foram fortemente associadas com a *ATB*. Já Taheri e colaboradores (2019), numa metanálise buscando investigar polimorfismos em *P2X7R*, apresentam que a presença do SNP rs3751143 foi correlacionada com *ATB* e *TB* extrapulmonar, ao passo que não encontraram relação entre outros SNPs, como rs2393799, rs1718119, rs208294, rs7958311 e rs2230911, com nenhuma das apresentações da infecção pelo *Mycobacterium* sp..

Em trabalho anterior realizado por nosso grupo, intitulado “Papel da indução de apoptose na resposta de linfócitos T citotóxicos em indivíduos coinfectados com tuberculose e vírus da imunodeficiência humana (TB-HIV)” (CAAE 21823713.8.0000.0040), Conceição e colaboradores (dados não publicados) realizaram uma revisão sistemática a respeito da variabilidade em genética envolvida na morte celular e na infecção por *Mtb*. Variabilidade genética em *TNF*, *TNFR*, *IL-1* e *P2RX7* foi encontrada na literatura relacionada à *TB* ativa. Além disso, este grupo avaliou a associação entre os polimorfismos *TNF-308* e *DDX39B -22/-348* e a progressão da tuberculose e coinfeção com HIV em Salvador, Bahia, Brasil. Os resultados indicaram haver uma relação entre polimorfismos nos genes estudados com suscetibilidade à tuberculose pulmonar (em comparação com a infecção latente) na população investigada, embora nenhuma associação com a coinfeção TB-HIV tenha sido encontrada.

Assim, uma avaliação de maior magnitude a respeito da influência destes polimorfismos na *TB* mostra-se de grande relevância para o entendimento sobre os aspectos inerentes ao hospedeiro que podem favorecer a infecção, bem como naqueles envolvidos na heterogeneidade da doença em diferentes populações e assim direcionar intervenções futuras.

2.7. DIVERSIDADE GENÉTICA DA MICOBACTÉRIA

O papel da diversidade genética da micobactéria também tem sido investigado por muitos grupos de pesquisa. As diferentes cepas e linhagens com diferentes perfis de virulência têm sido relacionadas a apresentação clínica da TB e aspectos epidemiológicos de disseminação da doença nas populações (CORREA-MACEDO, CAMBRI e SCHURR, 2019). Trabalhos têm demonstrado que há uma diferença entre mecanismos utilizados pelas micobactérias para promover sua sobrevivência entre cepas virulentas e avirulentas (QUINTERO-MACÍAS et al., 2012; SPIRA et. al., 2003).

Enquanto cepas virulentas são capazes de induzir anergia de macrófagos infectados, pela liberação de fatores e moléculas micobacterianas capazes de modular a capacidade de respostas destas células, as cepas avirulentas não apresentam a mesma capacidade e sucumbem mais facilmente à ação do sistema imunológico (LEE et al., 2019; NORTH e IZZO, 1993). Ainda, cepas virulentas são associadas a um rápido crescimento intracelular, bem como rápida disseminação para outras áreas do pulmão e outros órgãos (TRAM et al., 2018; SARKAR et al., 2012; ZHANG et al., 1998; PAUL; LAOCHUMROONVORAPONG e KAPLAN, 1996).

As cepas de *M. tuberculosis* também têm impacto diferenciado na resposta imune à doença. Romero e colaboradores (2012) demonstraram capacidade diferenciada de duas cepas isoladas de pacientes argentinos (das famílias Latin American and Mediterranean (LAM) e Haarlem) em induzir a apoptose de neutrófilos, assumida como benéfica ao hospedeiro, o que indica que a atuação da resposta imune pode ser modulada de forma variada pelas linhagens de Mtb.

A diversidade genética de Mtb também tem sido estudada na população brasileira, com os principais trabalhos buscando mapear as diferentes linhagens encontradas na nossa população, bem como a presença de cepas resistentes aos fármacos padrão (DE ALMEIDA et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2018; DANTAS et al., 2015). Entretanto, existe uma escassez de trabalhos buscando avaliar a relação destas diferentes linhagens na progressão da doença no Brasil e na interrelação entre a diversidade genética da bactéria e do hospedeiro como fator preponderante para a doença (CORREA-MACEDO; CAMBRI e SCHURR, 2019).

Nossa hipótese é que a diversidade genética do hospedeiro e do bacilo influenciam no curso da infecção de macrófagos, bem como há uma depleção na

atividade de linfócitos T CD8⁺ em indivíduos coinfectados na comparação com monoinfectados, e que estes fatores estão relacionados à extensão do dano tecidual, ao controle do vírus e do bacilo e, conseqüentemente, à gravidade da coinfeção.

Neste trabalho buscamos investigar o papel de diferentes vias de morte celular na doença tuberculosa, utilizando como abordagem o estudo da associação entre a presença de polimorfismos relevantes nessas vias com a expressão gênica de alvos selecionados, relacionando-os a parâmetros relacionados à gravidade e extensão da doença.

Em paralelo, propomos avaliar as diferenças no perfil linfocitários de pacientes com TB latente, ativa e coinfeção com HIV correlacionando-o com o nível de expressão de moléculas envolvidas na resposta imunológica do hospedeiro, bem como daquelas envolvidas em morte celular.

3. JUSTIFICATIVA

A tuberculose e o HIV apresentam-se como um grave problema de saúde pública, afetando milhares de pessoas mundialmente. A tuberculose (TB) é uma das causas mais comuns de morte entre os indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a principal comorbidade relacionada ao HIV, mesmo no estágio agudo da infecção onde ainda estão preservados os níveis de linfócitos T CD4⁺ (OMS, 2019a; b). Dados da OMS para 2018 indicam que 37,9 milhões de pessoas vivem com o vírus e que aproximadamente 770.000 mortes pela doença tenham sido registradas, das quais 250.00 em coinfectados TB-HIV (OMS, 2019a). O vírus da imunodeficiência humana complica a infecção pelo *M. tuberculosis* e a coinfeção está associada com um declínio clínico mais rápido. A infecção com o HIV aumenta o risco da reativação da tuberculose latente (LTBI) e indivíduos infectados com o vírus que adquirem uma nova infecção pelo bacilo têm altas taxas de progressão para a doença ativa (PHARMD et al, 2007; CAIN et al, 2009). As manifestações clínicas dos pacientes com TB-HIV geralmente são mais graves, com envolvimento pulmonar difuso e frequente disseminação extrapulmonar. A resposta imune em pacientes coinfectados difere dos pacientes que possuem uma das duas infecções apenas (HERBEIN e VARIN, 2010).

Muitos estudos experimentais evidenciam a importância da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ (CTLs) na morte de células alvo e sua eficiência na diminuição da viabilidade do *M. tuberculosis*, assim como em células infectadas com HIV. A falha na resposta das CTLs é utilizada como mecanismo de evasão por diversos patógenos, inibindo sua atuação na morte celular associada a grânulos (GURUNATHAN et al, 2009).

Estudos com desenvolvimento de vacinas candidatas contra infecções por patógenos intracelulares têm por finalidade melhorar a atividade da imunidade mediada por células, o que poderia retardar a progressão da doença e limitar a transmissão secundária por meio do controle da replicação dos patógenos. Dessa forma, muitos estudos têm focado nas células T CD8⁺ como alvo de candidatos vacinais pela sua importante participação em uma cadeia de eventos para eliminação de células-alvo. Ainda, é notável o papel da diversidade genética tanto do hospedeiro quanto do bacilo no curso da infecção e, portanto, precisam ser levadas em consideração no desenho de estratégias que visem tanto o desenvolvimento vacinal, mas também o tratamento e manejo clínico destes pacientes.

Diante do exposto, o estudo contribui para o entendimento dos eventos modulados no hospedeiro pela presença da micobactéria, especialmente aqueles envolvidos na resposta imune inata e adaptativa. Avaliamos o perfil de linfócitos T e de expressão gênica nos indivíduos associando-os com a mono- e coinfeção TB-HIV. Apresentamos também um levantamento de literatura sobre possíveis alvos a serem investigados quanto ao impacto na progressão da TB. Nesse sentido, além de indicar candidatos a biomarcadores destes espectros clínicos, nosso trabalho contribui para o conhecimento a respeito de processos importantes na relação patógeno-hospedeiro.

4. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da diversidade genética dos hospedeiros nas vias relacionadas à morte celular, bem como a influência da micobactéria no perfil expressão gênica de linfócitos T em indivíduos em mono- ou coinfeção TB-HIV.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1. Investigar a presença de polimorfismos em genes relevantes para as vias de morte celular associados à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

5.2. Avaliar o perfil de ativação, expansão e atividade citotóxica de linfócitos T nas diferentes formas clínicas da tuberculose.

5.3. Avaliar e comparar o perfil de expressão gênica em genes associados à função de linfócitos em indivíduos com tuberculose latente, TB, HIV e coinfectados TB-HIV.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. REVISÃO INTEGRATIVA

Com o objetivo de mapear o registro em literatura da ocorrência de polimorfismos em moléculas envolvidas nas vias de morte celular, de forma a possibilitar a correlação com a expressão gênica de alvos selecionados com as análises realizadas com amostras da nossa coorte de pacientes, foi realizada uma revisão integrativa de literatura em base de periódicos científicos, PubMed, com base nas diretrizes do PRISMA guidelines (PAJE et al., 2021).

Para tal, realizamos uma busca sistemática na base de periódicos científicos PubMed (disponível em www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) de artigos com avaliações de polimorfismos de base única em genes associados às diferentes vias de morte celular. Os trabalhos foram incluídos sem restrição de tempo, desde que indexados até o mês de abril de 2020, e obtidos a partir da seguinte estratégia de busca: ("Polymorphism, Genetic"[Mesh] OR polymorphisms OR polymorphism OR "SNP" OR "single nucleotide polymorphism") AND ("Cell Death"[Mesh] OR "cell death" OR "autophagy") AND (Humans[Mesh] OR patients OR population OR frequency) AND (COHORT OR case-control OR cross sectional) AND (HUMAN NOT animal).

6.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO:

Para os ensaios envolvendo análise de amostras coletadas de doadores voluntários, foram utilizadas amostras previamente coletadas pelo projeto intitulado “Papel da indução de apoptose na resposta de linfócitos T citotóxicos em indivíduos coinfectados com tuberculose e vírus da imunodeficiência humana (TB-HIV)” (CAAE 21823713.8.0000.0040, Protocolo CEP-CPqGM/Fiocruz nº 350/2011).

Foram recrutados pacientes atendidos no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM-SESAB), recém-diagnosticados com tuberculose, antes do início do tratamento e que realizaram teste para coinfeção com o HIV, pacientes atendidos no Centro Estadual Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa (CEDAP-SESAB) ou no Serviço Municipal de Assistência Especializada – SEMAE – diagnosticados com HIV, que foram submetidos a investigação de coinfeção com tuberculose; e voluntários sadios infectados com TB em infecção latente (LTBI), diagnosticada por prova tuberculínica (intradermorreação com endureção igual ou superior a 10 mm após 48-72h) ou reconhecimento específico de antígenos de *M.*

tuberculosis detectado por ensaio de liberação de interferon-gamma - IGRA (Quantiferon TB-GOLD test, Qiagen, CA).

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idades entre 18 e 60 anos e sem histórico de abandono do tratamento.

6.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO:

Foram incluídos no estudo pacientes ambulatoriais diagnosticados no CEDAP ou no Serviço Municipal de Assistência Especializada – SEMAE positivos para o HIV, com ou sem coinfeção com tuberculose confirmada por baciloscopia e cultura para o *Mycobacterium tuberculosis*; pacientes recém-diagnosticados com tuberculose por baciloscopia e/ou cultura positiva para o bacilo, que realizarem o teste para HIV implementado como rotina diagnóstica no HEOM; pacientes internados no mesmo hospital, com diagnóstico prévio de coinfeção TB-HIV, aderentes ao tratamento; e voluntários sadios com prova tuberculínica e/ou IGRA positivo(s). Foram incluídos os pacientes com idade entre 18 e 60 anos, homens e mulheres e excluídos pacientes com histórico de abandono do tratamento. Características sociodemográficas e clínicas foram obtidas a partir de prontuários médicos (BAAR, sorologia para o HIV, raio X, tratamento) e entrevista com questionário padronizado (renda familiar, comorbidades, sintomas, tuberculose recidiva, abandono do tratamento). Os pacientes HIV positivos foram caracterizados quanto à carga viral e número de células CD4 circulantes.

6.4 CÁLCULO AMOSTRAL:

Este estudo recrutou 100 voluntários mono infectados com TB, 80 voluntários mono infectados com HIV, 60 voluntários co infectados com TB-HIV e 66 indivíduos com LTBI. Considerando um erro de tipo I de 5%, uma diferença de pelo menos 25% na proporção de um dado genótipo entre os grupos de comparação e o tamanho mínimo dos grupos coletados de 60 indivíduos estimamos que o poder para a amostra coletada é superior a 80%.

6.5 AVALIAÇÃO DE PERFIL DE MORTE CELULAR EM AMOSTRAS DE DOADORES VOLUNTÁRIOS COM LTBI, TB, HIV E TB-HIV

Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose latente (LTBI), tuberculose ativa (TB) e coinfectados TB-HIV foram mantidas criopreservadas para análise por citometria de fluxo. A fenotipagem para distinção dos subconjuntos celulares e seu perfil de ativação foi realizada por imunomarcagem, utilizando anticorpos conjugados a fluorocromos, para reconhecimento de moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD45RO, CCR7, CD25, HLA-DR, CD279/PD-1, CD95/FAS) seguida de fixação, permeabilização celular e imunomarcagem de granzima B intracelular. A análise foi realizada em citômetro de fluxo BD LSFortessa, com aquisição mínima de 5.000 eventos.

6.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO EM GENES DE MORTE CELULAR E RELACIONADOS À FUNÇÃO DE LINFÓCITOS

Para quantificar níveis de expressão de moléculas relacionadas à morte celular e às respostas imunes inata e adaptativa, especialmente à função dos CTLs, foi utilizado RNA total extraído de amostras de sangue total de voluntários com LTBI, TB, HIV e TB-HIV.

Amostras de sangue total foram descongeladas e processadas com o kit RNeasy (Qiagen), conforme as orientações do fabricante e com adaptações. Sobre as amostras de sangue total ainda congeladas foram adicionados 300 µL do tampão de lise RLT (RNeasy, Qiagen). Após descongelamento, 600 µL do sobrenadante foram coletados e submetidos à agitação por 10 minutos. 600 µL de reagente fenol-clorofórmio foi adicionado ao preparado que foi novamente submetido a agitação por 10 minutos e então acondicionado em geladeira, onde permaneceram mais 10 minutos. Esses procedimentos foram repetidos mais uma vez até que um sobrenadante transparente foi obtido. Sobre este sobrenadante foi adicionado igual volume de etanol 70% e o material foi então processado conforme o protocolo do RNeasy (Qiagen) fornecido pelo fabricante.

O RNA obtido foi quantificado utilizando o NanoDrop instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) e encaminhado para as análises de transcriptômica realizadas em colaboração com o Dr. Johan Van Weyenbergh, utilizando plataformas disponíveis na Katholieke Universiteit Leuven (Bélgica).

7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

7.1. ANÁLISES DE INTERAÇÃO E DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (GDES)

A análise de interação e coexpressão entre os genes selecionados nas análises foi realizada através das ferramentas STRING interaction network e Cytoscape. A identificação da anotação da expressão destes genes em avaliações no contexto da tuberculose foi realizada utilizando dados disponíveis nas plataformas Gene Expression Omnibus (GEO) e EMBL-EBI e nos artigos originais.

7.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE CITOMETRIA DE FLUXO:

Sexo e proporções de diferentes perfis celulares foram comparados entre os grupos de estudo utilizando o teste exato de Fisher. Idade e massa corpórea (BMI) foram comparadas usando o teste U Mann-Whitney. Os valores de p foram ajustados usando o método de Holm-Bonferroni e considerados estatisticamente significantes quando < 0.05 .

A distribuição dos diferentes perfis de células T foi avaliada por análise de componentes principais e análise não supervisionada de agrupamento hierárquico usando o método de Ward. Nesta última análise, os dendrogramas representam a distância euclidiana (inferindo grau de similaridade). Os valores foram normalizados pelo método do Z-score. Para calcular as alterações nas dobras, os controles foram usados conforme indicado.

A avaliação da sensibilidade e especificidade da proporção de células Tcm CD8⁺HLA-DR⁺ em distinguir os grupos clínicos avaliados foi realizada a partir da Curva Característica de Operação do Receptor (ROC) e a precisão geral do marcador foi avaliada pelo cálculo da Área Sob a Curva (AUC).

Análises de hierarquização e das diferenças no perfil celular dos pacientes foram realizadas no programa R. Os heatmaps foram elaborados utilizando o pacote "ComplexHeatmap" e as análises de componentes principais utilizando o pacote "Factoextra". Os gráficos de dispersão e de setores foram confeccionados no Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc). Os diagramas de Venn foram confeccionados a partir de comparações feitas entre as frequências celulares para cada grupo clínico utilizando a ferramenta Draw Venn Diagram

(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). As análises da imunomarcagem em citometria de fluxo, foi realizada com auxílio do software FlowJo™ (Becton, Dickinson e Company).

7.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA:

Os dados foram representados como proporções, quando categóricos e como medianas e intervalos interquartis (IQR), nos casos de variáveis contínuas. As análises de significância foram realizadas usando o teste Kruskal-Wallis e one-Way-ANOVA. Os valores de p foram considerados estatisticamente significantes quando < 0.05 .

Para avaliar as similaridades e diferenças no perfil de expressão gênica, realizamos uma análise não supervisionada de agrupamento hierárquico usando o método de Ward, onde dendrogramas representam a distância euclidiana, e análises de componentes principais. A estimativa de distribuição do gene AK5 foi realizada por Análise de Densidade de Kernel e a projeção linear dos dados de expressão de genes possivelmente associados às condições clínicas estudadas foi realizada pela Projeção de FreeViz. Essas análises, além da confecção dos gráficos violin plot, foram realizadas no programa Orange Data mining (Copyright © University of Ljubljana).

A Análise de Curva Característica de Operação do Receptor (ROC) foi realizada para avaliar o potencial de genes selecionados em distinguir os grupos clínicos avaliados, e o cálculo da Área Sob a Curva (AUC) utilizado para avaliação da precisão geral de cada marcador. As análises de curva ROC e a confecção dos gráficos de barras, foram realizadas no Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc).

8. RESULTADOS

8.1. CAPÍTULO 01: MANUSCRITO

Revisão de literatura: Mapeamento de polimorfismos de base única (SNP) em genes de vias envolvidas na morte celular como ferramenta para a prospecção de possíveis alvos moleculares contra a tuberculose.

SANTANA, C. C.¹; DA SILVA, C. S.¹; MOTA, S. M.¹; CONCEIÇÃO, E. L.¹; BARBOSA, T.¹

¹Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz Bahia.

Autor correspondente: theolis.bessa@fiocruz.com.br

RESUMO

Na tuberculose, os eventos de morte celular podem tanto favorecer o controle da infecção, como a disseminação do bacilo. O *Mycobacterium tuberculosis* é capaz de modificar as vias de morte de células infectadas para manter-se viável. Nesse sentido, a variabilidade genética dos hospedeiros em genes associados a essas vias pode representar fator protetor ou de risco à TB. A identificação da assinatura genética associada à suscetibilidade à tuberculose em genes de vias de morte celular permite avançarmos na compreensão do papel dessas vias na infecção tuberculosa e pode sinalizar potenciais alvos de intervenção. Nós realizamos uma revisão de literatura de polimorfismos de base única (SNPs) em genes de vias de morte e rastreamos as anotações existentes para estes genes em bases de dados quanto às características funcionais, interações gênicas, vias enriquecidas e registro de expressão no contexto da TB, e encontramos 35 genes, dos quais muitos estavam diferencialmente expressos em estudos que compararam pacientes com doença ativa e indivíduos infectados saudáveis. Estes genes apresentam fortes interações e 60% deles são coexpressos, o que reforça um possível papel em mecanismos centrais para o controle da micobactéria.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, morte celular, polimorfismos genéticos, SNP.

INTRODUÇÃO

Com o número de casos e óbitos em constante evidência, a tuberculose (TB), doença originada da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) permanece como um problema para a saúde pública, especialmente em países onde o acesso aos direitos básicos é deficitário (OMS, 2021). Atualmente, as estratégias empregadas para o controle da TB são fundamentadas na vacinação de indivíduos suscetíveis e no tratamento farmacológico de casos ativos. Contudo, além da heterogeneidade da proteção conferida pela vacina BCG (*Bacillus Calmette–Guérin*), única opção vacinal disponível para a doença (BOMAN, 2016; MANGTANI et al., 2013), a necessidade de longos períodos de tratamento, somada a possibilidade de reativação da infecção nos indivíduos que possuem a forma latente da TB (CADENA; FORTUNE e FLYNN, 2017) e ao crescente surgimento de cepas de Mtb resistentes aos fármacos disponíveis, torna urgente a busca de novas abordagens no contexto da infecção (RAI et al., 2018; BOMAN, 2016; MANGTANI et al., 2013).

Um dos fatores determinantes para a capacidade do hospedeiro em eliminar a micobactéria está relacionado à capacidade de resposta imunológica destes indivíduos. Nesse cenário, os mecanismos de eliminação envolvem a participação da imunidade inata e adaptativa, com destaque ao papel dos macrófagos e linfócitos na resposta à doença (BUSSI e GUTIERREZ, 2019; GRACE e ERNST, 2016). Na interação entre o componente imunológico e a micobactéria, os processos relacionados à morte celular podem determinar o desfecho da infecção, pois desempenham importante papel na eliminação do bacilo, especialmente aqueles encontrados no interior dos macrófagos (GROVER et al., 2018; SU et al., 2016; DIVANGAHI; BEHAR e REMOLD, 2013). Entretanto, é sabido que o Mtb é dotado de mecanismos de evasão da resposta imune, incluindo o escape para o ambiente extracelular ou ainda, a modulação das vias de morte dos fagócitos (GROVER et al., 2018; AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016; HOSSEINI et al., 2016). Essa capacidade de evasão está diretamente relacionada com a virulência da micobactéria (LEE et al., 2019; ROMERO et al., 2012), entretanto há inconsistências de informações sobre como e quais vias são mais afetadas pelo bacilo.

O objetivo deste trabalho é prospectar potenciais vias afetadas pela interação micobactéria-hospedeiro a partir da compilação a partir da literatura da ocorrência de polimorfismos em moléculas envolvidas nas vias de morte celular com interface com

a modulação da resposta à tuberculose, evidenciada por estudos de expressão gênica. Dessa forma, buscamos levantar alvos com potencial importância para a melhor compreensão dos mecanismos afetados pela infecção tuberculosa, bem como para a proposição de novas estratégias terapêuticas contra a doença.

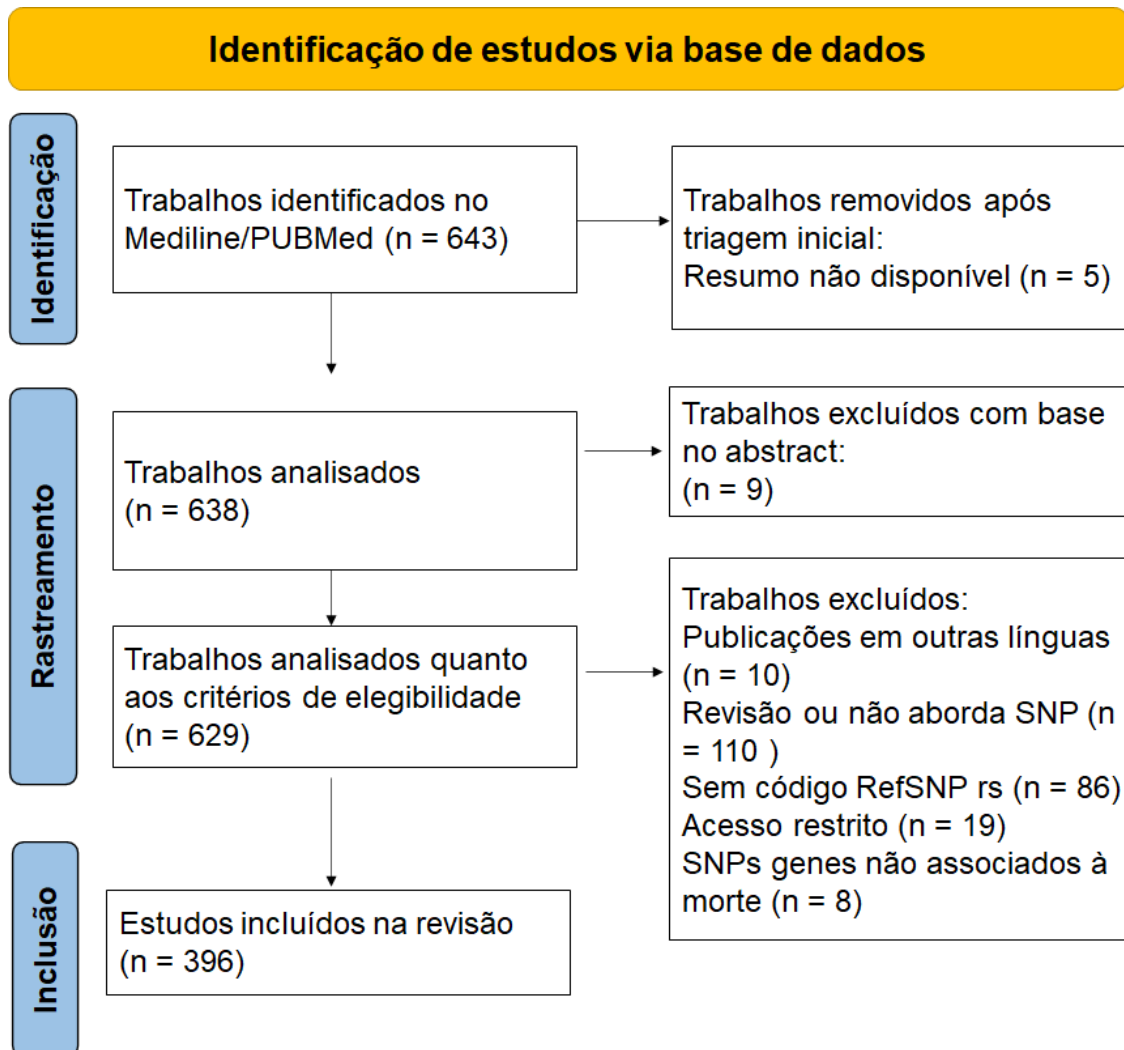
MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho consiste numa revisão de literatura realizada com base nas diretrizes do PRISMA guidelines (PAJE et al., 2021). Para tal, realizamos uma busca sistemática na base de periódicos científicos PubMed (disponível em www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) de artigos com avaliações de polimorfismos de base única em genes associados às diferentes vias de morte celular. Os trabalhos foram incluídos sem restrição de tempo, desde que indexados até o mês de abril de 2020, e obtidos a partir da seguinte estratégia de busca: ("Polymorphism, Genetic"[Mesh] OR polymorphisms OR polymorphism OR "SNP" OR "single nucleotide polymorphism") AND ("Cell Death"[Mesh] OR "cell death" OR "autophagy") AND (Humans[Mesh] OR patients OR population OR frequency) AND (COHORT OR case-control OR cross sectional) AND (HUMAN NOT animal).

Critérios de elegibilidade

Foram utilizados como critérios de inclusão a originalidade dos trabalhos publicados, apresentação em língua inglesa, ter como tema avaliação de polimorfismos de base única em genes associados às vias de morte celular e que fossem identificados com código RefSNP (rs) do NCBI database of genetic variation. Além do não cumprimento dos critérios anteriormente citados, foram excluídos artigos de revisão ou de métodos, com abordagem experimental in vitro de SNPs e os que não constavam abertos para consulta.

O fluxograma a seguir resume as estratégias utilizadas para as triagens dos trabalhos:



Análises de anotação funcional e enriquecimento

Através da lista de genes obtida na revisão, foi feita a investigação da existência de anotação destes genes para as vias relacionadas à morte celular e com associação tuberculose a partir de bases de dados públicos. Para isso, utilizamos as ferramentas Metascape e Enrichr (todas gratuitas e disponíveis on-line) e as informações obtidas por meio das bases de dados Bioplanet, Keeg e Wikipathway. Para observação da presença de genes em comum, foram gerados Diagramas de Venn, confeccionados a partir de comparações entre os conjuntos de resultados obtidos nas diferentes bases de dados utilizando a ferramenta Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). A avaliação das vias enriquecidas foi realizada com auxílio da ferramenta on-line Webgestalt e a plataforma Enrichr foi

utilizada para determinar a classificação funcional dos genes quanto aos processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares.

Análises de interação e de genes diferencialmente expressos (GDEs) em avaliações no contexto da tuberculose

A análise de interação e coexpressão entre os genes selecionados nas análises foi realizada através das ferramentas STRING interaction network e Cytoscape. A identificação da anotação da expressão destes genes em avaliações no contexto da tuberculose foi realizada utilizando dados disponíveis nas plataformas Gene Expression Omnibus (GEO) e EMBL-EBI e nos artigos originais.

RESULTADOS

Na pesquisa utilizando os buscadores escolhidos, foram identificados inicialmente 643 artigos dos quais 396 foram incluídos e outros 247 excluídos, conforme critérios de inclusão e exclusão anteriormente elencados. Dos trabalhos considerados no estudo, foram triados 1170 genes que somaram um total de 4467 diferentes polimorfismos.

A existência de anotação gênica para os genes listados neste levantamento foi pesquisada em bases de dados públicos e foram triados os genes conhecidamente envolvidos em vias de morte celular.

Inicialmente foram buscadas anotações relacionadas às vias clássicas de morte celular, como apoptose, autofagia, necrose, além de outras recentemente identificadas, como necroptose e piroptose, ou nomeadas genericamente como “morte celular” e “morte celular programada”. Dos 1170 genes encontrados no levantamento inicial da literatura, 355 genes foram identificados com anotações nas bases de dados para a apoptose, 102 genes para autofagia e 63 para as outras vias de morte (8 necrose, 53 necroptose, 3 piroptose, 2 morte celular e 13 morte celular programada - genes duplicados entre essas vias foram considerados apenas uma única vez nas análises) (tabelas suplementares 1 e 2).

Como utilizamos diferentes bases de dados de anotações gênicas, buscamos encontrar, dentre os genes triados para as vias de morte, os que continham registro simultâneo nas diferentes ferramentas utilizadas (figura 1). Dos genes listados para a apoptose, 36 foram comuns entre as bases de dados (fig. 1A); dentre os relacionados

à autofagia, 11 continham anotações para todas as ferramentas utilizadas (fig. 1B); e dentre os citados para as demais vias de morte, 4 foram associados às duas bases de dados em que essas vias foram identificadas (fig. 1C). A relação dos genes que compõem a interseção entre as bases de dados em cada uma das vias de morte analisadas está descrita na tabela 1.

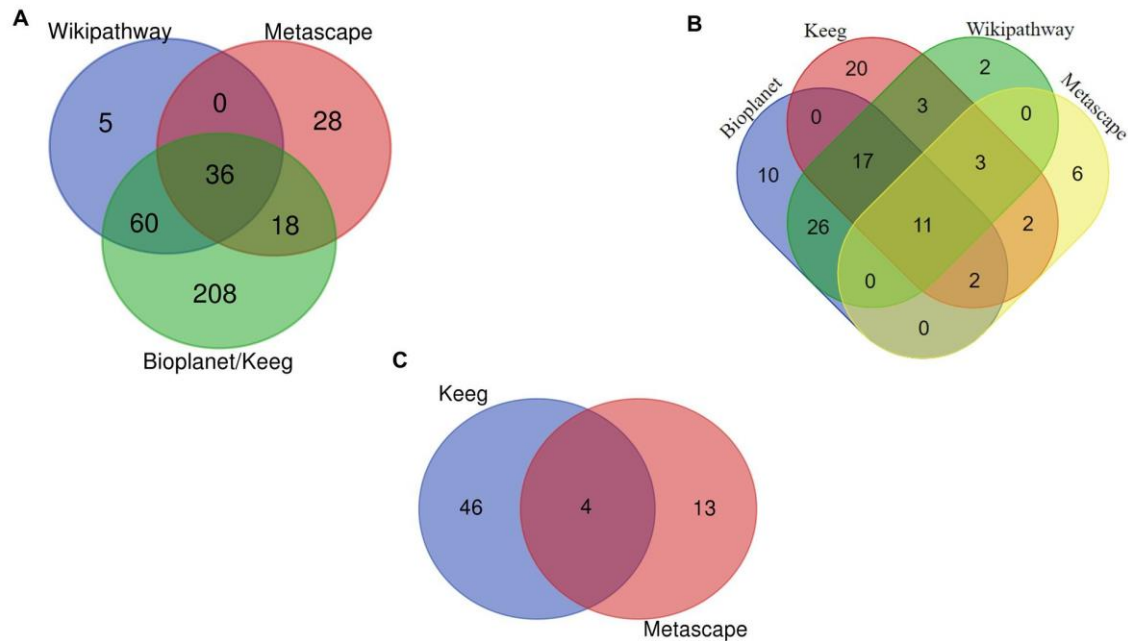


Figura 1. Número de genes triados de acordo com as vias de morte celular nas bases de dados utilizadas. A - Diagrama de venn com os genes triados e associados à apoptose nas diferentes bases de dados de anotações. 36 genes foram encontrados com anotação simultânea relacionada à apoptose em todas as ferramentas utilizadas **B** - Autofagia. Foram identificados 11 genes anotados nas diferentes ferramentas simultaneamente. **C** - Outras vias de morte. As duas bases de dados onde foram encontradas anotações para estas outras vias de morte, compartilham 4 genes em comum.

Tabela 1. Genes obtidos na análise de interseção entre as bases de dados de anotações gênicas para as vias de morte analisadas.

Vias	nº de genes centrais*	Genes (símbolos)
------	-----------------------	------------------

Apoptose	36	TRAF2; DFFB; FASLG; BID; BNIP3; CASP9; BBC3; BCL2L11; CFLAR; MAP3K5; TNFRSF1A; APAF1; XIAP; BIRC5; AKT2; TNFRSF6B; CASP10; BCL2L10; TNFSF10; TNFRSF10A; MAP2K4; CDKN2A; MAPK8; BCL2L1; TNFRSF1B; GZMB; TNFRSF21; BAX; TNFRSF10B; MCL1; BLK; TNFRSF10D; PAK2; BCL2A1; BCL2L14; MMP9;
Autofagia	11	ULK2; ATG7; ATG3; ULK1; ATG13; ATG12; PIK3C3; RB1CC1; LAMP2; ATG4A; GABARAPL1;
Outras vias de morte	4	IL1A; BCL2; BIRC3; FAS

* Genes apresentados nos centros das interseções.

A seguir, a presença de genes com função relacionada a mais de uma das vias de morte pesquisadas foi realizada. Do total de genes relacionados à apoptose, autofagia e às outras vias de morte celular encontrados nas ferramentas de anotações, 11 estavam relacionados de forma simultânea às diferentes vias investigadas (Figura 2). Contudo, quando a análise foi realizada utilizando apenas os genes mais estabelecidos para cada via (*i.e.* aqueles apresentados na figura 1 no centro das interseções para cada tipo de morte), não encontramos genes com funções compartilhadas (dados não mostrados).

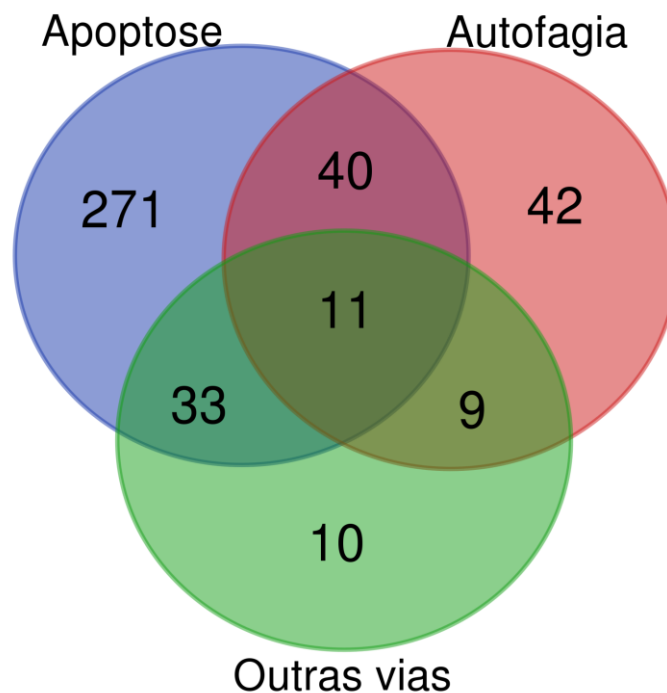


Figura 2. Interseção entre os genes encontrados com anotações simultâneas para as vias de morte analisadas. Foram encontrados 11 genes centrais compartilhados por todas as vias de morte identificadas neste estudo. 40 genes são compartilhados entre apoptose e autofagia, 33 entre apoptose e outras vias e 9 possuem anotação simultânea apenas para autofagia e outras vias.

A triagem quanto a anotação simultânea para as diferentes vias de morte, resultou na enumeração de 410 diferentes genes. A partir desta lista, nosso próximo passo consistiu em identificar os genes associados às vias de morte celular que também apresentassem anotações relacionadas à tuberculose. Dos 410 genes listados, 64 apresentaram anotações simultâneas para a TB e pelo menos uma das vias de morte celular (Tabela 2). Dos 64 genes encontrados com associação à tuberculose, 35 estão contidos nas interseções entre as diferentes vias de morte analisadas (Fig. 3) e foram selecionados para as análises seguintes.

Tabela 2. Relação de genes triados para as vias de morte com anotação simultânea para a tuberculose.

Interseções	Nº de Genes	Genes (símbolos)*

Apoptose - Autofagia - Outras vias	9	IFNG; BID; BCL2; IFNA21; IFNB1; MAPK8; IL1A; IL1B; MAPK10
Apoptose - Autofagia	9	AKT1; AKT3; MAPK1; MAPK14; IL6; RAF1; TGFB1; AKT2; BAD
Apoptose - Outras vias	8	TLR4; BAX; TNFRSF1A; IFNAR2; IFNGR2; TNF; CASP8; FADD
Autofagia - Outras vias	9	IFNA4; IFNA5; LAMP1; IFNA17; IFNA14; IFNA16; IFNA13; IFNA8; IFNA7
Apoptose	23	VDR; IL10; IL10RA; TLR1; RELA; TGFB2; APAF1; CARD9; NOS2; HLA-DRA; TLR6; PTPN2; RIPK2; NFKB1; CASP9; BCL10; IL18; IRAK4; CASP3; PP3CC; CASP10; IL12B; CREB1
Autofagia	2	LAMP2; PIK3C3
Outras vias	4	IFNGR1; JAK1; JAK2; TYK2

* Destaque em azul indicam os genes com anotação simultânea para as vias de morte em mais de uma base de dados.

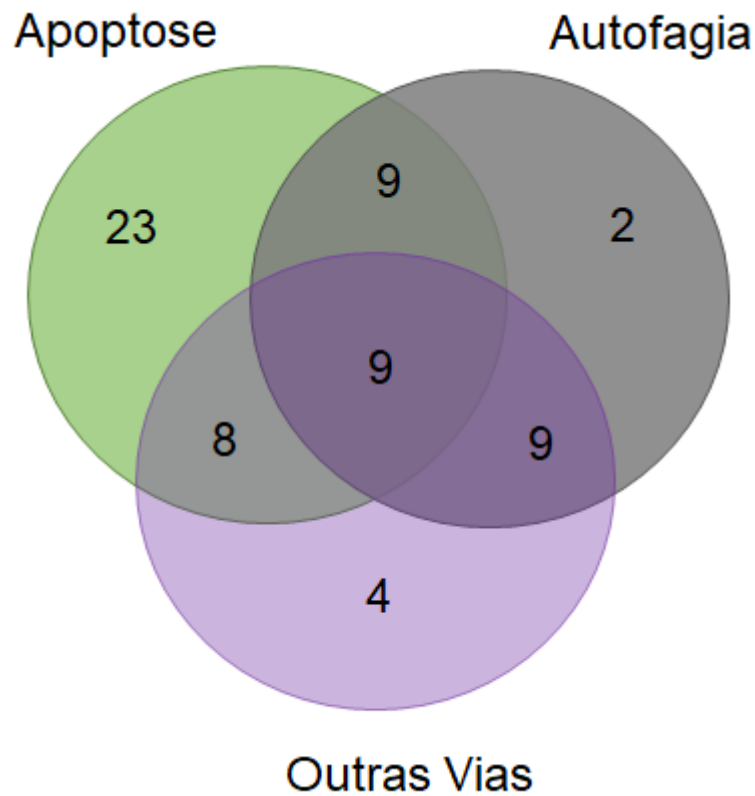


Figura 3. Interseção dos anotados para a tuberculose e classificados pelas vias de morte celular. Foram encontrados 35 genes centrais entre as vias de morte após a triagem de anotação para a tuberculose. 9 deles são compartilhados por todas as vias investigadas, 9 entre a apoptose e a autofagia, 9 entre a autofagia e as outras vias de morte e 8 entre a apoptose e o conjunto denominado “outras vias” de morte.

Esses genes foram relacionados a diferentes processos no contexto da tuberculose nas bases de dados de anotação, onde, além do desenvolvimento geral da TB, também foram encontrados registro do papel destes genes na infecção latente de humanos por *Mycobacterium tuberculosis* e na resposta imune à doença (quadro 1).

Quadro 1. Relação dos genes anotados nas bases de dados nos diferentes processos associados à tuberculose.

Base de dados	Descrição	Genes (símbolos)
Bioplanet (2019)	Latent infection of Homo sapiens with Mycobacterium tuberculosis	NOS2;
KEEG (2021)	Tuberculosis	IFNA5; IFNA4; IFNA7; TNF; IFNA8; CASP9; CASP8; PPP3CC; LAMP1; CASP10; AKT2; CASP3; AKT3; LAMP2; AKT1; IL12B; JAK2; JAK1; IL10; IFNA13; IFNA14; APAF1; IFNA16; IFNGR1; RIPK2; IFNA17; IFNGR2; IL18; IRAK4; TNFRSF1A; TLR1; IL1A; CREB1; IFNG; IL1B; PIK3C3; TLR6; RAF1; TLR4; BCL10; RELA; MAPK8; MAPK1; FADD; BID; IFNA21; TGFB2; TGFB1; NOS2; VDR; BAD; IFNB1; IL10RA; CARD9; MAPK14; NFKB1; MAPK10; IL6; BCL2; HLA-DRA; BAX
Wikipathway (2021)	Immune response to tuberculosis WP4197	IFNAR2; IFNGR1; IFNGR2; TYK2; JAK2; PTPN2; JAK1

A classificação funcional (processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares) e análise das principais vias enriquecidas por estes genes também foi realizada. A figura 4 demonstra a classificação funcional dos 35 genes triados nas análises anteriores e como estes genes estão agrupados conforme esta classificação.

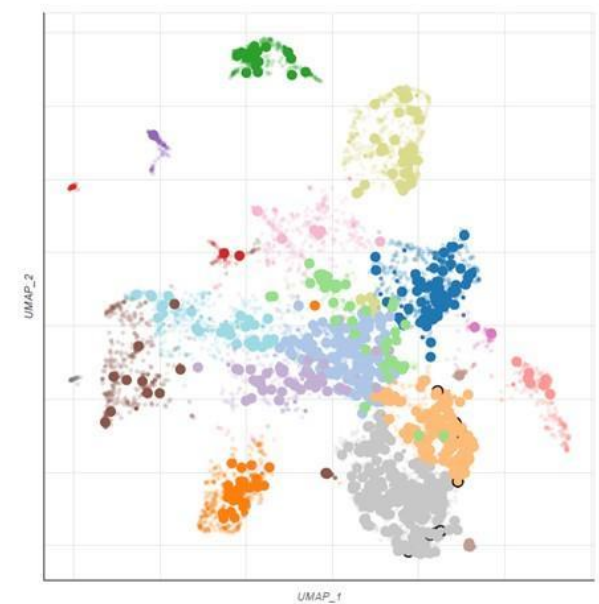
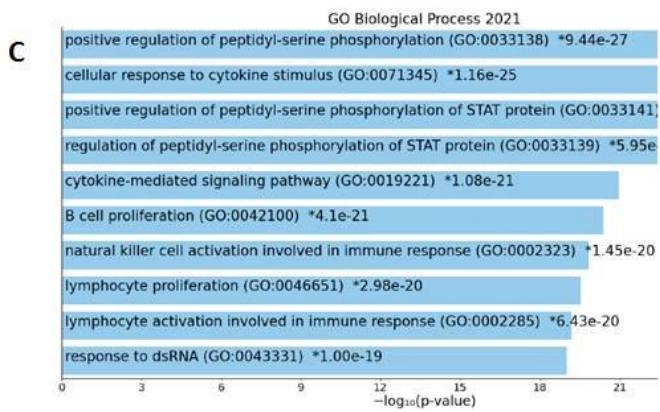
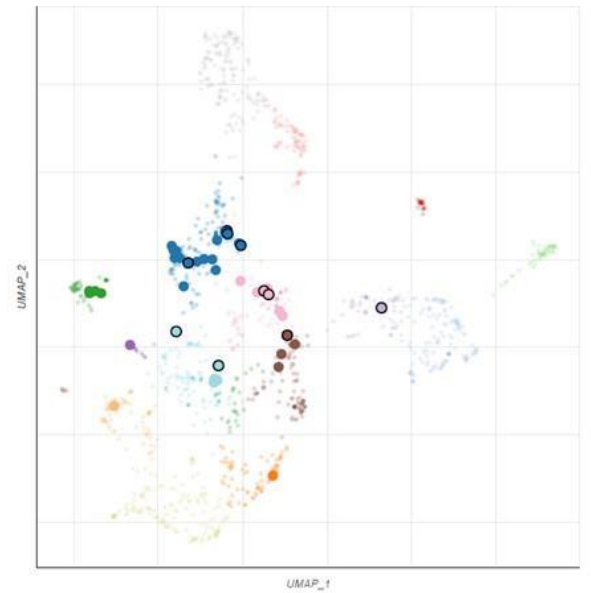
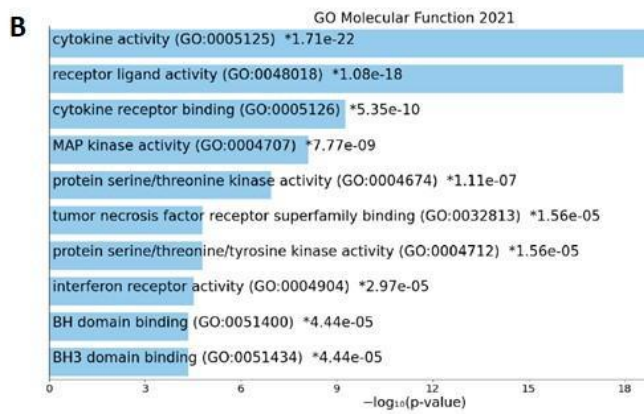
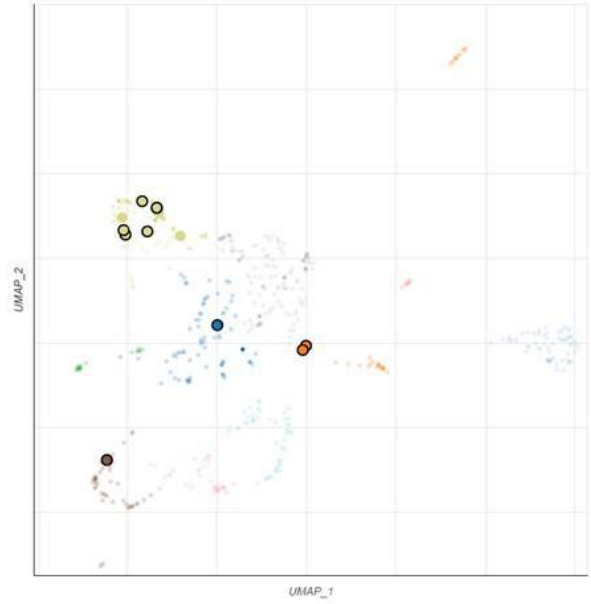
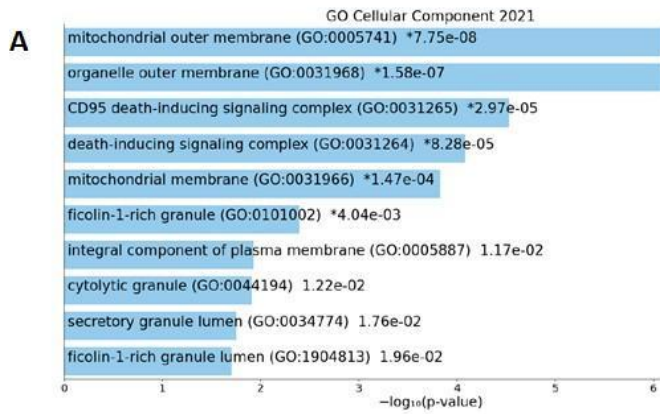


Figura 4. Classificação funcional dos 35 genes triados para as vias de morte celular e associados à tuberculose. A - 10 principais termos enriquecidos para os componentes celulares; **B** - 10 principais termos enriquecidos para as funções moleculares, e **C** - 10 principais termos enriquecidos para os processos biológicos. O painel à direita apresenta agrupamentos de conjuntos de genes semelhantes. Pontos maiores, com contornos pretos, representam termos significativamente enriquecidos.

Nas categorias de classificação funcional para os genes analisados, verificamos a presença entre os termos enriquecidos envolvidos nos processos de morte celular, dos quais podemos citar o complexo indutor de morte de CD95 e complexo de sinalização de morte celular em componentes celulares onde estão envolvidos os genes CASP8, FADD; atividade de citocinas e de MAP quinase e de receptores de interferon, bem como superfamília de receptores de ligação de TNF na categoria funções moleculares, com a participação dos genes codificadores da classe dos interferons e seus receptores, além de TGFB1, IL1A, IL6, IL1B, FADD, BID, TNF e as MAP quinases; e entre os processos biológicos temos os interferons listados nesta revisão envolvidos na resposta imunológica e na proliferação de linfócitos, bem como na resposta imune mediada por células NK e na resposta celular aos estímulos de citocinas, processos nos quais outros genes também estão envolvidos como TGFB1, TNF, IL6, IFNG, AKT1, RAF1 e BCL2 (tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos genes listados para as 10 principais vias enriquecidas nas categorias funcionais GO Componentes celulares, Funções moleculares e Processos biológicos.

	Termo	valor de p	valor de q	Genes sobrepostos
Componentes celulares	mitochondrial outer membrane (GO:0005741)	7,75E-02	0.000004	[CASP8, BAD, BCL2, BAX, RAF1, BID]
	organelle outer membrane (GO:0031968)	1,58E-01	0.000004	[CASP8, BAD, BCL2, BAX, RAF1, BID]
	CD95 death-inducing signaling	2,97E+01	0.000554	[CASP8, FADD]

	complex (GO:0031265)			
	death-inducing signaling complex (GO:0031264)	8,28E+01	0.001159	[CASP8, FADD]
	mitochondrial membrane (GO:0031966)	1,47E+02	0.001643	[CASP8, BAD, BCL2, BAX, RAF1, BID]
	ficolin-1-rich granule (GO:0101002)	4,04E+03	0.037689	[LAMP1, MAPK1, MAPK14]
	integral component of plasma membrane (GO:0005887)	1,17E+04	0.085313	[IFNAR2, IL6, LAMP1, IFNGR2, TLR4, TNF, TNFRSF1A]
	cytolytic granule (GO:0044194)	1,22E+04	0.085313	[LAMP1]
	secretory granule lumen (GO:0034774)	1,76E+04	0.109507	[TGFB1, MAPK1, MAPK14]
	ficolin-1-rich granule lumen (GO:1904813)	1,96E+04	0.109507	[MAPK1, MAPK14]
Funções moleculares	cytokine activity (GO:0005125)	1,71E-16	1,18E-14	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, TGFB1, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNA17, IFNA8, TNF, IL1A, IL6, IFNG, IL1B, IFNA21]

receptor ligand activity (GO:0048018)	1,08E-12	3,73E-11	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, TGFB1, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNA17, IFNA8, TNF, IL1A, IL6, IFNG, IL1B, IFNA21]
cytokine receptor binding (GO:0005126)	5,35E-04	1,23E-02	[IFNA5, IL6, IFNA14, IL1B, FADD, IFNA8, IFNA21]
MAP kinase activity (GO:0004707)	7.765930 e-09	1.339623e -07	[MAPK10, MAPK8, MAPK1, MAPK14]
protein serine/threonine kinase activity (GO:0004674)	1,11E-01	1,53E+00	[MAPK10, MAPK8, AKT2, AKT3, AKT1, MAPK1, MAPK14, RAF1]
tumor necrosis factor receptor superfamily binding (GO:0032813)	1,56E+01	1,54E+02	[FADD, BID, TNF]
protein serine/threonine/tyrosine kinase activity (GO:0004712)	1,56E+01	1,54E+02	[MAPK10, AKT1, MAPK14]
interferon receptor activity (GO:0004904)	2,97E+01	2,56E+02	[IFNAR2, IFNGR2]
BH domain binding (GO:0051400)	4,44E+01	3,07E+02	[BCL2, BAX]
BH3 domain binding (GO:0051434)	4,44E+01	3,07E+02	[BCL2, BAX]

Processos biológicos	positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation (GO:0033138)	9,44E-21	1,12E-17	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, TGFB1, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNA17, IFNA8, TNF, IL6, IFNG, AKT1, RAF1, IFNA21]
	cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	1,16E-19	6,91E-17	[IFNAR2, IFNA5, IFNA4, IFNA7, TGFB1, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNGR2, IFNA17, IFNA8, TNF, TNFRSF1A, IL1A, IL6, MAPK8, IL1B, BCL2, AKT1, TLR4, IFNA21]
	positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation of STAT protein (GO:0033141)	2,82E-18	1,12E-15	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, IFNA14, IFNG, IFNA16, IFNB1, IFNA17, IFNA8, IFNA21]
	regulation of peptidyl-serine phosphorylation of STAT protein (GO:0033139)	5,95E-18	1,77E-15	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, IFNA14, IFNG, IFNA16, IFNB1, IFNA17, IFNA8, IFNA21]
	cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	1,08E-15	2,57E-13	[IFNAR2, IFNA5, IFNA4, IFNA7, TGFB1, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNGR2, IFNA17, IFNA8, TNF, TNFRSF1A, IL1A, IL6, IFNG, IL1B, BCL2, AKT1, IFNA21]

B cell proliferation (GO:0042100)	4,10E-15	8,13E-13	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNA17, BCL2, IFNA8, IFNA21]
natural killer cell activation involved in immune response (GO:0002323)	1,45E-14	2,47E-12	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNA17, IFNA8, IFNA21]
lymphocyte proliferation (GO:0046651)	2,98E-14	4,44E-12	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNA17, BCL2, IFNA8, IFNA21]
lymphocyte activation involved in immune response (GO:0002285)	6,43E-14	8,52E-12	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNA17, IFNA8, IFNA21]
response to dsRNA (GO:0043331)	1,00E-13	1,20E-11	[IFNA5, IFNA4, IFNA7, IFNA14, IFNA16, IFNB1, IFNA17, IFNA8, IFNA21]

Podemos observar também que, entre as vias enriquecidas por estes genes, estão, além da necroptose e apoptose, outros processos que contribuem para os eventos de morte celular, como as vias de sinalização toll-like e NOD-like receptor, a interação citocina-receptores e a via de sinalização PI3K-Akt (Figura 5). Essas análises corroboram o papel destes genes triados nos eventos que levam à morte celular, além de adicionalmente apresentarem contribuição deles em outros processos celulares importantes.

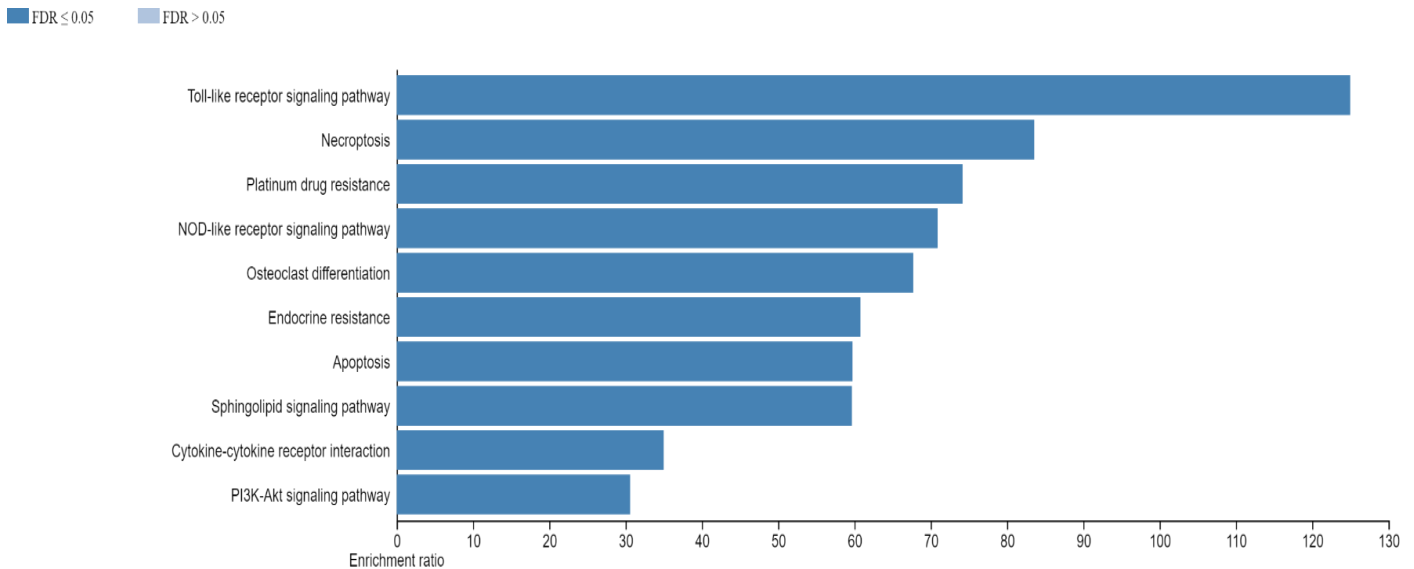


Figura 5. 10 principais vias enriquecidas com os genes de morte celular associados à tuberculose. Além das vias sabidamente relacionadas à morte celular, vias como resistência endócrina, diferenciação de osteoclastos e resistência à platina foram enriquecidas.

Partimos então para a avaliação da existência de interações entre os genes selecionados. A evidência de interações entre os genes triados para as vias de morte e tuberculose é verificada na figura 6. As associações proteína-proteína representadas pelas arestas, indicam que os genes contribuem entre si para uma determinada função, entretanto, não significam, necessariamente, que estes genes estejam associados fisicamente. O cálculo do score do nível de confiança na determinação das interações considera parâmetros como: associação em bases de dados curadas (busca automatizada e não supervisionada); co-expressão (genes com expressão correlacionada num grande número de experimentos); vizinhança genômica; dados experimentais e bioquímicos (co-purificação, co-cristalização, interações genéticas, etc); fusão de genes; co-ocorrência entre genomas; homologia e menção conjunta em resumo no Pubmed (String Consortium, 2021).

Os dados demonstram que todos os genes selecionados apresentam algum tipo de interação com, no mínimo, um outro gene da lista. Os scores de interação nesta rede variaram de médio (e.g. 0.402 para IFNA13 e IFNG - arestas esmaecidas) a muito alto (e.g. 0.999 para CASP8 e TNFRSF1A - arestas robustas).

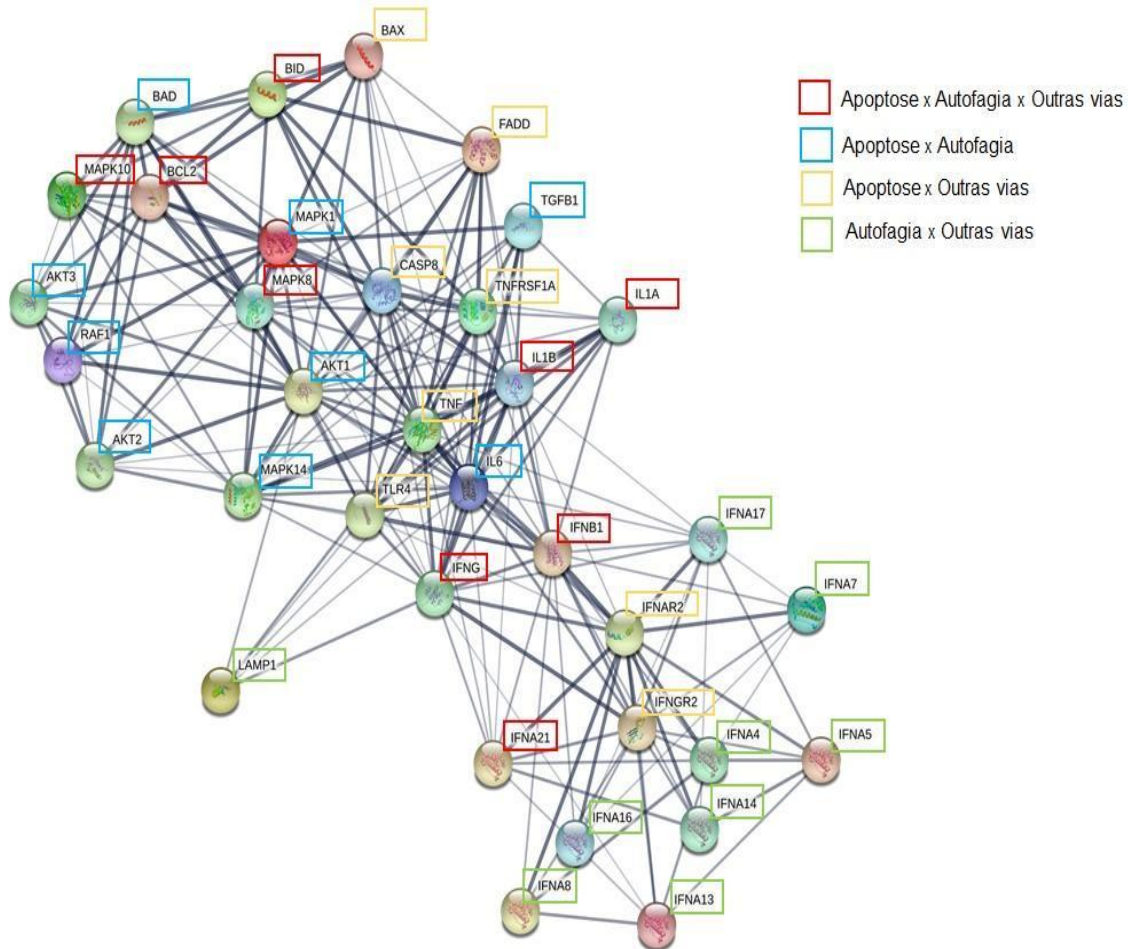


Figura 6. Associação entre os genes triados para as vias de morte e associados à tuberculose. O mapa demonstra que todos os genes analisados interagem com, no mínimo, dois outros genes identificados. As forças de interação variaram entre média (arestas esmaecidas) e muito alta (arestas robustas) de acordo com os parâmetros de homologia, vizinhança genômica, co-ocorrência, co-expressão, interação experimental, fusão de genes, anotação em base de dados curada e associação no PUBMED. Os nós representam as proteínas, onde todas apresentam estrutura conhecida (nós transparentes com estrutura molecular) e as cores das caixas nos símbolos dos genes indicam as associações dos genes com as vias de morte estudadas.

As interações com scores de nível de confiança considerados altos ou muito altos foram classificadas entre 0.700 e 0.900, respectivamente (tabela suplementar 3). O grau de interação apresentado pelas proteínas codificadas por estes genes indica que elas estão, em parte, conectadas biologicamente.

Ainda buscando investigar a relação funcional entre os genes selecionados, analisamos as evidências de co-expressão entre eles. Os scores de co-expressão são calculados com base nos padrões de expressão de mRNA e na co-regulação de proteínas fornecidos pela ferramenta on-line ProteomeHD (Protein Co-regulation

Analysis) e sumarizados pelo STRING. Os maiores scores foram encontrados entre IL1A e IL1B e entre IL1B e TNF (Figura 7, tabela 4).

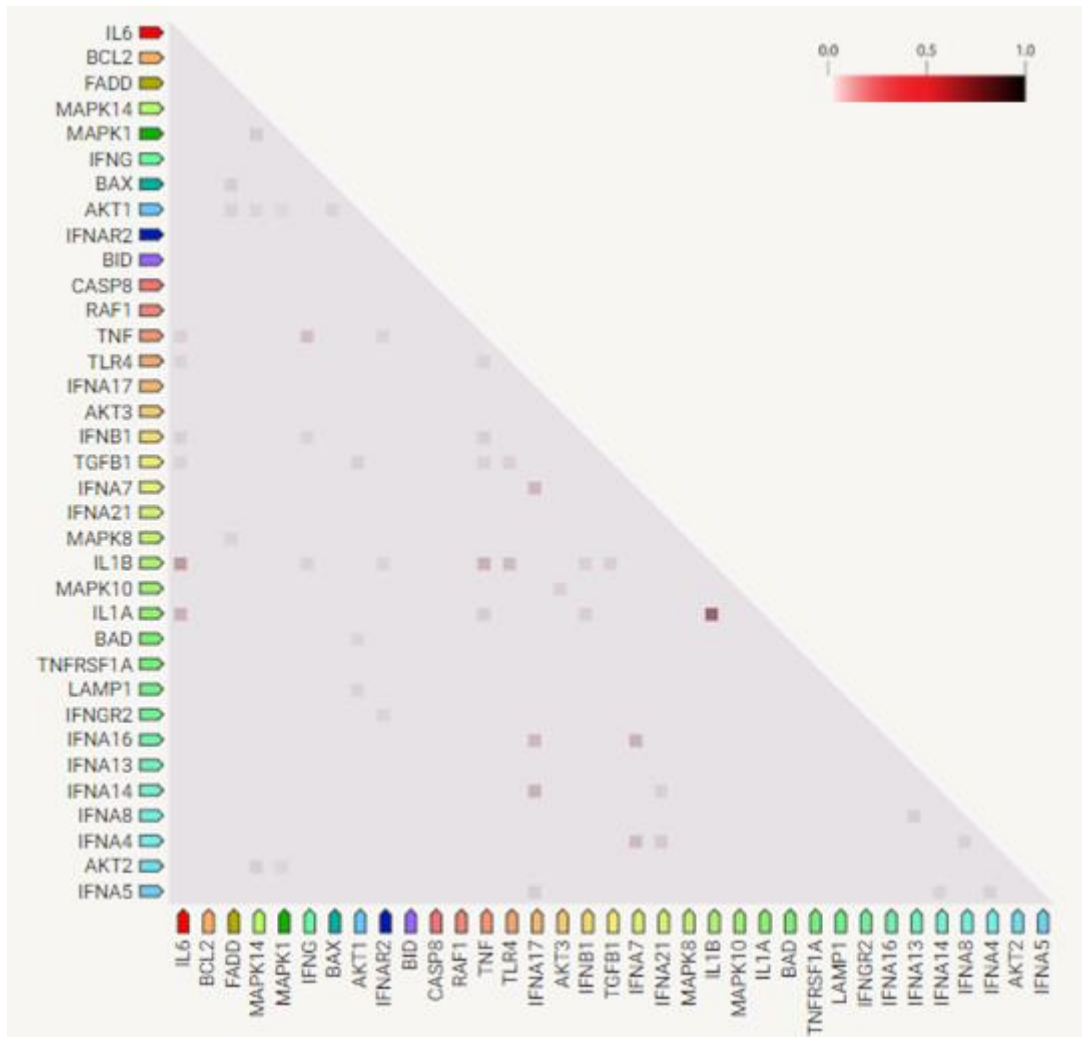


Figura 7. Co-expressão entre os 35 genes listados para as vias de morte e associados à tuberculose. Nota-se a presença de diversos pontos de co-expressão entre os genes analisados, entretanto, os maiores valores foram encontrados entre IL1B e IL1A e entre IL1B e TNF.

Tabela 4. Scores de co-expressão identificados para os genes analisados. consideramos arbitrariamente os scores de expressão a partir de 0.100.

gene 1	gene 2	score de coexpressão
--------	--------	----------------------

<i>il1a</i>	<i>il1b</i>	0.761
<i>il1b</i>	<i>tnf</i>	0.462
<i>il6</i>	<i>il1b</i>	0.427
<i>il6</i>	<i>il1a</i>	0.376
<i>tnf</i>	<i>il1a</i>	0.289
<i>ifna7</i>	<i>ifna</i>	0.214
<i>ifna17</i>	<i>ifna14</i>	0.212
<i>ifna7</i>	<i>ifna17</i>	0.185
<i>ifna17</i>	<i>ifna16</i>	0.185
<i>ifna7</i>	<i>ifna4</i>	0.172
<i>tlr4</i>	<i>il1b</i>	0.160
<i>tnf</i>	<i>ifng</i>	0.152
<i>tnf</i>	<i>il6</i>	0.125
<i>mapk10</i>	<i>akt3</i>	0.117
<i>mapk14</i>	<i>akt2</i>	0.110
<i>ifna4</i>	<i>ifna21</i>	0.110
<i>tnf</i>	<i>ifnb1</i>	0.107
<i>il1a</i>	<i>ifnb1</i>	0.107
<i>mapk14</i>	<i>mapk1</i>	0.106

<i>il6</i>	<i>ifnb1</i>	0.101
------------	--------------	-------

A fim de complementar nossa análise exploratória dos genes, seguimos com a investigação de registro do perfil de expressão destas moléculas selecionadas no contexto da tuberculose. Para tal, utilizamos os dados públicos registrados nas ferramentas Expression Atlas (EMBL-BI) e GEO Profiles (NCBI). Os genes foram classificados, de acordo com o nível de expressão apresentado, em superexpressos e subexpressos, conforme condições experimentais. Para essa classificação, consideramos uma variação de no mínimo 1,5 vezes em relação aos controles. Os dados de expressão desses genes estão sumarizados na tabela 5.

Os resultados apresentados indicam que *bcl2*, *bid*, *ifna13*, *ifna8* apresentaram-se superexpressos, independente das condições experimentais utilizadas. TNF apresentou superexpressão apenas em infecções experimentais in vitro, enquanto que, nas avaliações de indivíduos infectados com tuberculose, esse gene apresentou-se subexpresso. Para outros genes, foram encontradas variações no comportamento de expressão, o que pode, contudo, ser um reflexo da diferença nas condições experimentais utilizadas. Essas diferenças, além da carência de dados relativos à expressão destes genes no curso da tuberculose, dificultam uma comparação acurada entre os resultados.

Tabela 5. Mapeamento de genes envolvidos em vias de morte celular diferencialmente expressos no contexto da tuberculose.

Gene	Técnica	Condições experimentais	Status de expressão	obs	Fold change	Referência
<i>akt3</i>	RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'crianças'	1,8	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG-U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '18 h'	1,8	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 6 meses vs 'normal'	-1,6	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
<i>bcl2</i>	RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'crianças'	2,9	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	superexpresso	tuberculose vs 'normal'	1,7	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)

	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	superexpresso	tuberculose e tratamento por 3 meses vs 'normal'	1,5	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
<i>bid</i>	RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'crianças'	1,6	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
<i>casp8</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	subexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '18 h'	-1,6	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

<i>ifna13</i>	RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'adultos'	2,7	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
<i>ifna8</i>	RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'adultos'	2,7	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
<i>ifnb1</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG-U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' em 'adultos'	3,6	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

<i>ifng</i>	RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'crianças'	2,9	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG-U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 3 meses vs 'normal'	-1,6	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
<i>il1a</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG-U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose latente'	7,8	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose vs 'normal'	-7,3	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose meningeal'	7,2	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 3 meses vs 'normal'	-6,5	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose pulmonar'	5,9	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 6 meses vs 'normal'	-5,7	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' in 'macrófagos' após '18 h'	5,2	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' in 'macrófagos' após '48 h'	4,8	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '4 h'	3,6	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '4 h'	3,5	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '18 h'	3	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
	RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'crianças'	1,7	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
<i>il1b</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose meningeal'	6,3	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose latente'	5,7	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose vs 'normal'	-4,5	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose pulmonar'	4,3	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '18 h'	3,7	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'none' in 'dendritic cell' at '4 hour'	3,5	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'crianças'	3,4	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 6 meses vs 'normal'	-3,3	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 3 meses vs 'normal'	-3,3	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '48 h'	2,8	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '18 h'	2,6	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '48 h'	2,5	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '4 h'	2,3	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

	RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'adultos'	1,8	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
<i>il6</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG-U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose latente'	7,4	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG-U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose meningeal'	7	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose pulmonar'	6,1	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' in 'macrófagos' após '18 h'	4,9	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' in 'macrófagos' após '48 h'	4,8	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '4 h'	4,1	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose vs 'normal'	-3,9	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 3 meses vs 'normal'	-3,2	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)

RNA-Seq mRNA differential	Disfunção multifacetada de macrófagos das vias aéreas de crianças em resposta ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vs 'normal' em 'crianças'	3,1	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 6 meses vs 'normal'	-2,6	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '4 h'	2,6	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '18 h'	2,5	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
<i>mapk8</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose vs 'normal'	-1,7	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 3 meses vs 'normal'	-1,5	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)

<i>tgfb1</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	subexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '18 h'	-1,9	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	subexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '48 h'	-1,7	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
<i>tlr4</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	subexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '48 h'	-1,9	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

<i>tnf</i>	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose latente'	6	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose meningeal'	5,3	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de macrófagos humanos de pacientes com tuberculose estimulados com lisado de <i>M. tuberculosis</i>	superexpresso	lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv vs 'não infectados' em 'tuberculose pulmonar'	4,3	Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles (Thuong et al., 2008)

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '4 h'	2,7	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '18 h'	2,2	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 3 meses vs 'normal'	-1,9	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose vs 'normal'	-1,9	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 [HG- U133_Plus_2]	Dados de expressão de sangue periférico	subexpresso	tuberculose e tratamento por 6 meses vs 'normal'	-1,9	Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. (Cai et al., 2014)
Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	subexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'células dendríticas' após '48 h'	-1,7	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*

	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '4 h'	1,5	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2,0 [HG- U133_Plus_2]	Perfil de transcrição de células dendríticas humanas e macrófagos infectados com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	superexpresso	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' vs 'não infectados' em 'macrófagos' após '48 h'	1,5	extraído direto da plataforma EMBL-EBI*
<i>tnfrsf1a</i>	Agilent Whole Human Genome Microarray 4x44K 014850 G4112F (85 cols x 532 rows)	Análise microarray de córtex cerebral de pacientes com esclerose múltipla progressiva, meningite, tuberculose e alzheimer	subexpresso	tuberculose meningeal vs 'normal'	-2,8	Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions (Fischer et al., 2013)

DISCUSSÃO

A modulação, pelo *Mycobacterium tuberculosis*, de genes e vias envolvidos nos processos de morte celular é bastante estudada (HASSUNA et al., 2021; YANTI et al., 2020; LIN et al., 2019; TAHERI et al., 2019; WU et al., 2018). A morte das células infectadas é um dos mecanismos que contribuem para a contenção do bacilo por favorecer a eliminação da bactéria no meio intracelular (UPADHYAY; MITTAL e PHILIPS, 2018). Contudo, indícios apontam que o Mtb é capaz de modular a resposta imunológica e os mecanismos de morte celular para outros mais favoráveis à sua sobrevivência (UPADHYAY; MITTAL; PHILIPS, 2018; MAHAMED et al., 2017).

Além disso, a suscetibilidade à TB é também atribuída a mecanismos genéticos (ABEL et al., 2018), e variações em genes envolvidos nas vias de morte celular podem contribuir para a incapacidade do hospedeiro em conter a infecção (MANDAL et al., 2019; TAHERI et al., 2019 WU et al., 2018). A presença de polimorfismos em genes de vias de morte é amplamente associada à menor habilidade de células mononucleares em impedir o crescimento de *M. tuberculosis*, sugerindo o impacto dessas alterações genéticas na progressão da doença (FERNANDO et al. 2005). Neste trabalho nós realizamos um levantamento na literatura de polimorfismos em genes associados às vias de morte celular, a fim de identificar aqueles que possam representar potenciais alvos de intervenções experimentais em avaliações que contribuirão para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos associados à TB.

Nós identificamos 64 genes de vias de morte associados com a tuberculose nas bases de dados públicos de anotações genéticas. Destes, 35 foram recorrentemente associados a múltiplas vias e então selecionados como promissores alvos de intervenção. Esses genes estavam associados tanto à vias bem estabelecidas de morte, como a apoptose e a necrose (aqui incluída no grupo “outras vias”), quanto à vias recentemente classificadas, necroptose e autofagia, por exemplo. A investigação da variabilidade genética em muitos genes identificados nas nossas avaliações vêm sendo tema de muitos estudos (HASSUNA et al., 2021; CUBILLOS-ANGULOS et al., 2019; WANG et al., 2018; HIJIKATA et al., 2012).

O tipo de morte celular desencadeada na infecção por Mtb contribui para determinar o desfecho da doença: contenção e possível cura, ou facilitação da multiplicação e disseminação dos bacilos no organismo. A apoptose de macrófagos,

por exemplo, inicialmente favorece o controle da infecção, em infecções tardias, no entanto, a apoptose de células fagocíticas presentes no granuloma pode favorecer a disseminação bacteriana (GROVER et al., 2018). Ainda, a apoptose dos macrófagos infectados fornece um elo importante para a imunidade adaptativa, onde a apresentação de antígenos contribui para uma eficiente ativação de T virgens (HOSSEINI et al., 2016; WEISS; SHAIBLE, 2015; DIVANGAHI et al., 2009; WINAU et al., 2006;).

Cepas avirulentas de *M. tuberculosis* induzem apoptose em células apresentadoras de antígeno (APCs) por meio de TNF / TNFR, receptores toll like (TLRs), especialmente TLR-2/4 (LIN et al., 2019; GROVER et al., 2018; WANG et al., 2017; LIN et al., 2014), Fas / FasL ou alterando a expressão de Bax / Bcl-xL (LI et al., 2016; AGUILÓ et al., 2014). A variabilidade genética em genes envolvidos nessa via de morte é associada de forma frequente à ocorrência da tuberculose (ZHOU et al., 2018; GHAMARI et al., 2016).

O TNF é uma citocina envolvida na via extrínseca da apoptose. A produção de TNF é regulada tanto pela transcrição quanto pela pós-transcrição. Muitos polimorfismos alélicos do gene TNF foram descritos e o polimorfismo na posição -238 está dentro de uma sequência reguladora putativa, onde uma substituição de G para A define duas variantes (TNF-G e TNF-A). Em relação ao polimorfismo na posição -308, a presença de G define a variante comum TNF1 e a presença de A define a variante menos comum TNF2. A presença do alelo TNF -308A é considerada associada à maior transcrição do gene do TNF e consequente superprodução dessa citocina (YAMAMOTO-FURUSHO et al., 2004).

Alguns polimorfismos genéticos também foram TNF associados à TB. Wang e colaboradores (2018) descreveram que rs1799724T em detrimento do alelo C em *TNFA* como fator protetivo contra tuberculose pulmonar. Já num estudo em indivíduos da China e Tibet, os SNPs rs1799964 e rs1800630, foram associados à suscetibilidade para a doença (Wu et al., 2019). Os mesmos autores encontraram associação de rs1799724 e rs1800629, com a TB, mas apenas na população tibetana.

O TNF se liga a dois receptores, TNFR-1 (codificado pelo gene TNFRSF1A) e TNFR-2 (codificado pelo gene TNFRSF1B). O TNFR-1 é o receptor dominante para a ligação do TNF e pode ativar o NF- κ B. Ele medeia a apoptose e funciona como um regulador da inflamação (SECHER et al., 2009). O TNFR-1 possui SNPs na região promotora, no exon 1 e nos íntrons 2, 4, 6, 7 e 8 (AKSENTIJEVICH et al., 2001; BAZZONI et al., 2000). Quatro polimorfismos foram descritos na região do promotor (-383 A / C, -609 G / T, -580 A / G e -383 A / C) e exon 1 (+36 A / G) (LUBAHN et al., 2010; PALANCA et al., 2010). No contexto da TB, não encontramos investigações de variabilidade genética em TNFRSF1A, entretanto, alterações na expressão deste receptor foram descritas como inibidores da resposta de células T e na reativação precoce da doença em LTBI (DAMBUZA et al., 2016), além de capazes em discriminar a infecção ativa pelo bacilo em indivíduos HIV⁺ (KASSA et al., 2016).

A apoptose induzida por TNF e seus receptores pode ainda envolver o recrutamento de FADD (Fas associated via death domain). A ativação da porção N-terminal desta proteína leva ao recrutamento de caspase 8 e desencadeamento das cascatas destas cisteíno-proteases (SHING; HASSAN; BOSE, 2016; KRAMER, 2000). Essa proteína também parece ser importante para o desenvolvimento inicial de linfócitos T (BUDD; YEH; TSCHOPP, 2006). O gene FADD foi relacionado à ativação de apoptose por BCG em células epiteliais de vias aéreas (LAI et al., 2007) e em macrófagos derivados de pacientes com tuberculose pulmonar, o *Mtb* levou a uma inibição deste gene e redução da apoptose (YANTI et al., 2020).

O estresse do retículo endoplasmático (ER) resultante da infecção de células fagocíticas por cepas avirulentas de *M. tuberculosis* ou da estimulação com antígenos micobacterianos também foi é um indutor de apoptose nessas células (GROVER et al., 2018; LIN et al., 2014). Em última análise, esse estresse leva à ativação de IRF3, em uma via que é dependente da mobilização de STING (estimulador de genes de interferons) e TKB1 (TANK-binding quinase 1). O IRF3 também está envolvido na fosforilação de Bax e ativação da caspase 8 (CUI et al., 2016). O antígeno micobacteriano Rv0934 desempenha um papel na apoptose induzida por estresse ER, e entre os genes envolvidos, TLR2/4, MAPK, MCP-1 foram diretamente implicados neste processo (LIN, et al., 2014).

Em estudo recente, Wu e colaboradores (2020) encontraram associação do polimorfismo rs11536889 em TLR4 com a proteção da TB em populações da China e do Tibet, resultado divergente do encontrado para a mesma população em

investigação anterior do mesmo grupo (WU et al., 2018). Na população brasileira, polimorfismos neste gene foram associados tanto à conversão ao teste tuberculínico, quanto ao desenvolvimento de casos ativos em contactantes de pacientes com TB (CUBILLOS-ANGULOS et al., 2019). Investigações quanto às variantes genéticas em CASP8 e BAX não foram encontrados para a infecção pelo bacilo, contudo níveis de Caspase 8 mostraram-se reduzidos em pacientes coinfetados TB-HIV em comparação com aqueles infectados apenas pelo vírus (WANCHU et al., 2004).

A superexpressão de BAX em pacientes com tuberculose também já foi descrita (ZHANG et al., 2020). BID e BAD são outros membros da família de Bcl2 que atuam na modulação de morte celular (AGUILÓ et al., 2014; YOULE; STRASSER, 2008). BID é ainda associado a um tipo de morte celular necrótica dependente de ferro, a ferroptose (NEITEMEIER et al., 2017) e foi descrito anteriormente em macrófagos infectados por *M. tuberculosis* (O'SULLIVAN et al., 2007), mas polimorfismos nesse gene e a TB não foram ainda associados. BAD, no entanto, embora não tenha sido ainda explorado quanto à presença de variantes na TB, para a sarcoidose, doença de caráter inflamatório com aspectos semelhantes à tuberculose, já exista descrição quanto ao favorecimento da doença em caso de polimorfismos específicos (FISCHER, 2013).

Embora a investigações de variações genéticas em MAP quinases e BCL2 não tenham sido listadas, BCL2 apresentou um alto poder discriminatório (AUC = 0.81) entre indivíduos com baciloscopia positiva e contactantes de indivíduos com TB (MIHRETH et al., 2014) e antígenos micobacterianos foram associados à inibição em vias relacionadas à MPK1/ERK1/2, levando a uma menor expressão de TNF e IL-6, favorecendo a sobrevivência da micobactéria (LI et al., 2015). As outras MPKs relacionadas no nosso estudo (MPK8, MPK10 e MPK14) não foram alvos de avaliações genéticas na tuberculose e quadros clínicos associados, embora sejam relacionados como potenciais alvos de intervenção na TB e em outras infecções bacterianas (ALAM et al., 2021; BASU et al., 2021).

Associações de SNPs em IL-6 com a tuberculose são recorrentes. Eles foram relacionados com o risco de desenvolvimento com a doença ativa (Wu et al., 2018; He et al., 2018) incluindo na população brasileira (MILANO et al., 2016).

A morte celular necrótica pode ser um fator importante a contribuir com o dano tecidual pelo processo inflamatório e na transmissão dos bacilos [66]. Estudos sugerem que as cepas patogênicas de *Mtb* usam a inibição da apoptose como um

mecanismo de virulência e induzem a necrose, evitando os mecanismos de defesa do hospedeiro, promovendo a lise celular e a sua disseminação para os macrófagos circundantes (SOHN et al., 2009). Esse tipo de morte celular pode envolver mecanismos moleculares programados, ao contrário do que há muito se sustenta na literatura (GALLUZI et al., 2017). A necrose é atualmente classificada como morte celular acidental ou programada. Necroptose, piroptose, pironecrose, ETose (NETose, METose e EETose) e necrose dependente de CYPD são vias de necrose programadas (MOHARRER; ASALLA; BANERJEE, 2018).

A piroptose e a pironecrose compartilham mecanismos de ativação semelhantes, envolvendo a formação do complexo molecular inflamossoma, a formação de poros na membrana plasmática e o extravasamento de componentes celulares. Ambos são estimulados mediante o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores semelhantes a NOD (NLR) e TLR. A piroptose é dependente das caspases 1, 3, 4, 5 e 11, enquanto a pironecrose é independente de caspases (GALLUZI et al., 2017; SHI et al., 2015). Embora tenha sido relatada em culturas de alta carga (WELIN et al., 2011), a pironecrose não foi até agora implicada na infecção por *Mtb*.

O papel da piroptose na infecção por *Mtb* permanece obscuro. Fatores presentes na parede celular *Mtb* mostraram ser capazes de desencadear a ativação do inflamassoma de NLRP3 (MISHRA et al., 2010) e morte celular piroptótica (GONG et al., 2019). Foi demonstrado que cepas virulentas de *M. bovis* induzem a piroptose de macrófagos por meio da ativação de NLRP7 (ZHOU et al., 2016), enquanto a deleção dos genes micobacterianos Rv3365c (DANELISHVILI et al., 2011) e Rv0198c (*zmp1*) (MASTER et al., 2008) leva ao aumento da atividade da caspase-1 e produção de IL-1 β por células infectadas, fornecendo evidências do papel que esses genes desempenham na limitação da morte celular piroptótica. ESAT-6, presente em H37Rv, induz a produção de pro-IL-1 β e a secreção da citocina de uma forma dependente da caspase-1 (MISHRA et al., 2010).

Além da piroptose, o IL1B é também envolvido na ocorrência de apoptose e autofagia. Polimorfismos em IL1B influenciam a suscetibilidade à TB em algumas populações. Em pacientes iranianos com tuberculose pulmonar, uma diferença positiva e significativa foi encontrada em IL1B na posição -889, onde o genótipo TT foi mais presente em pacientes com tuberculose pulmonar (AMIRZARGAR et al., 2006). Em pacientes com TB de Gâmbia, a diminuição do risco de TB foi associada ao alelo

IL1B -511C, contudo, não houve associação entre o polimorfismo IL1B +3953 T>C com TB nesta população.

De forma semelhante à IL1B, IL1A tem papel atribuído em processos inflamatórios, nos quais se apresenta superexpressa. Essa citocina, ao se ligar a IL1R, contribui para ativação de NF- κ B and MAPK e a produção de mediadores pró-inflamatórios (MALIK; KANNEGANTI, 2019). No nosso levantamento bibliográfico, esta citocina foi associada a todas as categorias de morte investigadas, mas seu padrão de expressão nas avaliações com a tuberculose não está claro (CAI et al., 2014; THUONG et al., 2008). Recentemente, Salum e cols. (2020) encontraram associação entre o polimorfismo CC -899C>T em IL1A com a TB.

IFNG também é associado à ocorrência da piroptose (GALLUZZI et al., 2018). Na TB, a autofagia induzida por IFNG em macrófagos é associada à proteção (DUTTA et al., 2012), e a inibição do processo autofágico recentemente relacionada a um pior prognóstico da doença (LI et al., 2016). Em estudo realizado no Egito, pacientes com homozigotos AA em INF- γ +874 apresentaram um risco significativamente mais alto em desenvolver a TB que os homozigotos TT ou heterozigotos AT, com o alelo A contribuindo para um risco 2 vezes maior para a doença (HASSUNA et al., 2021). Resultados semelhantes para este polimorfismo foram encontrados por Thada e cols. (2016) que associaram o genótipo AT desse mesmo polimorfismo a um maior risco para a doença. Já as investigações realizadas no Irã, SNPs de IFN- γ (G+2109A) e seu receptor IFN- γ R1 (G-611A) não apresentaram influência com a TB (SHAMSI et al., 2016).

Outra molécula da família dos interferons, IFNA17, foi anteriormente avaliada quanto ao impacto na tuberculose e na sarcoidose, mas apenas esta última apresentou resultados positivos (AKAHOSHI et al., 2004) e, nas avaliações registradas tendo o receptor IFNGR2 como alvo de investigação em vietnamitas, a presença de variações genéticas foi correlacionada com uma maior proteção frente à TB em populações jovens (HIJIKATA et al., 2012). Para as outras moléculas da família dos interferons encontradas nesta revisão, bem como para o receptor IFNAR2, investigações a respeito da influência da variabilidade genética na TB não foram encontradas.

A necroptose é um tipo de morte celular caracterizada pela ativação de RIPK3 e MLKL, resultando em aumento da permeabilidade da membrana plasmática (GROOTJANS; BERGHE; VANDENABEELE, 2017). Esta via de morte celular é

desencadeada pelo aumento da produção de TNF como ocorre na infecção por Mtb. Na ausência de caspase-8, a sinalização de TNF induz a desubiquitinação de RIPK1, permitindo o recrutamento e ativação de RIPK3, formando um complexo necrossomo. O MLKL, que é fosforilado pelo necrossomo, se transloca para a membrana plasmática e forma poros ou altera a permeabilidade da membrana interferindo no funcionamento de canais de cálcio (GROOTJANS; BERGHE; VANDENABEELE, 2017; ROCA e RAMAKRISHNAN, 2013).

Os componentes da parede celular Mtb podem estimular TLR2, levando à translocação de NF- κ B para o núcleo, induzindo assim a expressão de TNF. Durante certos estágios da infecção, a expressão mais alta de TNF provocada por cepas de Mtb virulentas (versus avirulentas) pode levar ao aumento da necroptose, pelo bloqueio da atividade da caspase-8, inibindo assim a apoptose e favorecendo a necroptose (REMIJSEN et al., 2014; KUNDU et al., 2009). A necroptose também pode ser ativada por uma via associada a inibição de NAD⁺ de uma maneira independente de RIPK1 e TNF (PAJUELO et al., 2018). In vivo, a necroptose foi demonstrada em fibroblastos no granuloma murino, mas não em macrófagos, apesar da presença de RIPK3 e TNF (BUTLER et al., 2017).

O Mtb regula positivamente as moléculas envolvidas na necroptose, como MLKL, RIPK1 e ZBP1, porém o bloqueio desta via não mostrou afetar o desfecho da doença (STUTZ et al., 2018). A avaliação de variabilidade genética em TNF, participante desta via, já foi mencionada aqui.

A autofagia é igualmente investigada no contexto da tuberculose e sua contribuição para a eliminação de bactérias intracelulares foi primeiramente reportada para a TB (GUTIERREZ et al., 2004). Estudos apontam a xenofagia promovida por este processo celular como um eficiente mecanismo de defesa contra a micobactéria (CHAI et al., 2019) embora sua capacidade de evasão já tenha sido reportada (DERETIC, et al., 2006).

A autofagia assemelha-se à apoptose pelo fato de ocorrer tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, contribuindo para a reciclagem de estruturas celulares no primeiro caso, e para a contenção de microrganismos ou outros estímulos danificadores de células e tecidos no último (RAVANAN, SRIKUMAR e TALWAR, 2017; PARZYCH e KLIONSKY, 2014). A autofagia também pode contribuir para a montagem de uma resposta imune adaptativa eficaz durante a infecção, pois aumenta a apresentação do antígeno via MHC II (SAINI et al., 2016; LEE et al., 2010), e seu

papel microbicida foi amplamente demonstrado na infecção por Mtb (ZHANG et al., 2017; REKHA et al., 2015), além de prevenir o acúmulo de lipídios usados pelas micobactérias como fonte de nutrição (OUIMET et al., 2016). A detecção de DNA micobacteriano por sensores citoplasmáticos promove a ativação de outros componentes moleculares envolvidos neste processo, culminando com a produção de IFNG que leva à indução de autofagia (WATSON et al., 2015). De forma não surpreendente, o Mtb modula essa resposta celular em uma tentativa de escapar da eliminação (SAINI et al., 2016).

Na tentativa de modular a autofagia, Mtb induz a expressão de mi-RNAs na célula hospedeira (OUIMET et al., 2016). O miR-33, por exemplo, que é superexpresso em células infectadas com micobactérias, atua diretamente na atividade de ATG5, ATG12, LAMP1, UVRAG, MAP1LC3B e AMPK; a inibição desse mi-RNA mostrou prejudicar a proliferação de bacilos (OUIMET et al., 2016). Por outro lado, miR-23a-5p, que é superexpresso em macrófagos infectados com Mtb, é capaz de alvejar TLR2 e pode modular a sinalização de TLR2 / MyD88 / NF-κB (GU et al., 2017).

Polimorfismos em LAMP1 foram associados ao sucesso na infecção de *M. tuberculosis* cepa Beijing em ensaios realizados por Songane e colaboradores (2012), embora a contribuição para o desenvolvimento com a TB não tenha sido apresentada claramente.

AKT1 é outra molécula associada aos processos determinantes para o sucesso da infecção pelo *M. tuberculosis*. Além de seu papel nos mecanismos de morte celular, especialmente na autofagia, sua atividade também contribui para os mecanismos de polarização dos macrófagos durante o estímulo infeccioso gerado pelo bacilo (SHA et al., 2021). Polimorfismos neste gene (baixa proporção de IVS3+18 C/C alta proporção de C/T) foram associados com o desenvolvimento da doença (WANG et al., 2010). Não foram encontradas evidências de associação de variantes genéticas de AKT2 e AKT3 no contexto da TB, contudo, Martínez-Neri e colaboradores (2015) demonstraram a capacidade de filtrado de proteínas de *Mycobacterium bovis* em ativar a via JAK2/STAT3-5 por promover a fosforilação de AKT2, e ensaios farmacológicos onde as vias AKT/mTOR foram inibidas, tiveram como resultado uma redução na resposta contra o bacilo tanto in vitro quanto em PBMCs de voluntários (LACHMANDAS et al., 2016).

TGFB1 apresenta papel dual no contexto da tuberculose. Sua participação na reativação de Mtb em modelos de granulomas *in vitro* após tratamento com Adalimumab, um neutralizador de TNF- α , foi recentemente reportada (ARBUÉS et al., 2020). Em avaliação a respeito da correlação entre polimorfismos genéticos e o nível de citocinas em amostras de pacientes durante o tratamento anti-TB, Paresi e colaboradores (2013) encontraram associação positiva entre a variante TGFB1 +21C/T e a maior presença de TGFB1 em pacientes no início do tratamento, a qual eles atribuem a possibilidade de maior persistência da TB, uma vez que em altas concentrações deste fator estão correlacionadas com a inibição de macrófagos e de citocinas como o IL1A e TNF, favorecendo o crescimento micobacteriano.

Por fim, a fosforilação de Raf-1/bcl-2 está relacionada à morte celular por apoptose por levar à disrupção de microtúbulos (BLAGOSKLONNY et al., 1997). Embora não tenhamos encontrado estudos abordando SNPs em tuberculose associados ao gene RAF1, a literatura relata que a ativação desta proteína após o reconhecimento de patógenos como o Mtb e o HIV por células dendríticas através de receptor do tipo lectina, contribui para a acetilação de NF-kappaB, modulando a transcrição de genes relacionados à resposta imune nessas células (DUNNEN; GRINGHUIS; GEIJTENBEEK, 2008). Esses eventos, contribuem para a modulação positiva da expressão de IL10, IL12 e IL6, interferindo, em última instância, na ativação de linfócitos T helper apresentando impacto no desfecho das infecções (GRINGHUIS et al., 2009).

Através do nosso levantamento da literatura, nós demonstramos que, genes envolvidos nas diferentes vias de morte podem representar alvos interessantes no desenho de estratégias de investigação sobre a tuberculose, visando compreender os aspectos genéticos do hospedeiro, mas também da micobactéria, que estão associados à heterogeneidade das apresentações clínicas e de respostas aos tratamentos. Os dados aqui sumarizados, contribuem para a eleição de alvos farmacológicos e experimentais a serem investigados futuramente na busca de melhores estratégias de controle da TB.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Genes em vias de morte celular são amplamente associados com a progressão da tuberculose e a variabilidade genética em muitos destes genes parece

desempenhar papel importante na suscetibilidade ou proteção à infecção. Nosso levantamento demonstrou que diversos genes conectam as diferentes vias morte, muitas das quais importantes não apenas no contexto de proteção contra doenças, mas também em processos fisiológicos, de modo que as intervenções objetivando compreender os mecanismos de resistência à TB necessitam ser bem desenhadas, evitando-se assim efeitos deletérios ao hospedeiro. Nesse sentido, nosso trabalho pode contribuir para o levantamento de potenciais alvos de intervenção no contexto da TB, bem como para a revisão do atual estado do conhecimento sobre variabilidade genética em moléculas de morte e a tuberculose.

REFERÊNCIAS

- ABEL, L. et al. Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: present knowledge and future perspectives. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, p. 1-12, 2017.
- AGUILÓ, N. et al. Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell Death and Disease**, p. 1-10, 2014.
- AKAHOSHI, M. et al. Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. **Hum Genet**, v. 114, p. 503-509, 2004.
- AKSENTIJEVICH, I. et al. The tumor-necrosis-factor receptor–associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. **The American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 2, p. 301-314, 2001.
- ALAM, A. et al. Human gene expression profiling identifies key therapeutic targets in tuberculosis infection: A systematic network meta-analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 87, p. 1-27, 2020.
- AMARAL, E. P., LASUNSKAIA, E. B. e D'IMPÉRIO-LIMA, M. R. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. **Microbes and Infection**, v. 18, p. 11-20, 2016.
- AMIRZARGAR, A. A. et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. **European cytokine network**, v. 17, n. 2, p. 84-89, 2006.
- ARBUÉS, A. et al. TNF- α antagonists differentially induce TGF- β 1-dependent resuscitation of dormant-like *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 2, p. e1008312, 2020.

- BASU, S. et al. In silico structure evaluation of BAG3 and elucidating its association with bacterial infections through protein-protein and host-pathogen interaction analysis. **Journal Cellular, Biochemistry**, p. 1-13, 2021.
- BAZZONI, F. et al. Identification of novel polymorphisms in the human TNFR1 gene: distribution in acute leukemia patients and healthy individuals. **Immunogenetics**, v. 51, n. 2, p. 159-163, 2000.
- BLAGOSKLONNY, M. V. et al. Raf-1/bcl-2 Phosphorylation: A Step from Microtubule Damage to Cell Death. **Cancer Research**, v. 57, p. 130-135, 1997.
- BOMAN, G. The on-going story of the Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination. **Acta Paediatrica**, v. 105, n. 12, p. 1417-1420, 2016.
- BUDD, R. C.; YEH, W-C. e TSCHOPP, J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, v. 6, p. 196-204, 2006.
- BUSSI, C. e GUTIERREZ, M. G. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 4, p. 341-361, 2019.
- BUTLER, R. E. et al. The balance of apoptotic and necrotic cell death in Mycobacterium tuberculosis infected macrophages is not dependent on bacterial virulence. **PLoS one**, v. 7, n. 10, p. e47573, 2012.
- CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M. e FLYNN, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. **Natural Reviews in Immunology**, v. 17, n. 11, p. 691–702, 2017.
- CAI, Y et al. Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92340, 2014.
- CHAI, Q. et al. A *Mycobacterium tuberculosis* surface protein recruits ubiquitin to trigger host xenophagy. **Nature Communications**, v. 10, p. 1-17, 2019.
- CUBILLOS-ANGULO, J. M. et al. Polymorphisms in tlr4 and tnfa and risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection and development of active disease in contacts of tuberculosis cases in brazil: a prospective cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, p. 1027-1035, 2019.
- DAMBUZA, I. M. et al. Persistent p55TNFR expression impairs T cell responses during chronic tuberculosis and promotes reactivation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-17, 2016.
- DANELISHVILI, L. et al. Inhibition of the plasma-membrane-associated serine protease cathepsin G by Mycobacterium tuberculosis Rv3364c suppresses caspase-1 and pyroptosis in macrophages. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 281, 2012.

- DERETIC, V. et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. **Cellular Microbiology**, v. 8, p. 719-727, 2006.
- DIVANGAHI, M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. **Nature immunology**, v. 10, n. 8, p. 899-906, 2009.
- DIVANGAHI, M.; BEHAR, S. M.; REMOLD, H. Dying to Live: How the death modality of the infected macrophage modulates immunity to Tuberculosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 783, p. 103-120, 2013.
- DUNNEN, J. den; GRINGHUIS, S. I. e GEIJTENBEEK, T. B. H. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. **Cancer Immunol Immunother**, v. 58, p. 1149–1157, 2009.
- DUTTA, R. K. et al. IL-6 inhibits IFN- induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 44, p. 942-954, 2012.
- FERNANDO, S. L. et al. Gene Dosage Determines the Negative Effects of Polymorphic Alleles of the P2X7 Receptor on Adenosine Triphosphate–Mediated Killing of Mycobacteria by Human Macrophages. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 1, p. 149-155, 2005.
- FISCHER, M. T. et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. **Brain**, v. 136, n. 6, p. 1799-1815, 2013.
- GALLUZZI, L. et al. Necroptosis: mechanisms and relevance to disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 12, p. 103-130, 2017.
- GHAMARI, E. et al. Susceptibility to pulmonary tuberculosis: host genetic deficiency in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene and tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2). **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, p. 136-137, 2016.
- GONG, Z. et al. Regulation of host cell pyroptosis and cytokines production by *Mycobacterium tuberculosis* effector PPE60 requires LUBAC mediated NF- κ B signaling. **Cellular Immunology**, v. 335, p. 41–50, 2019.
- GRACE, P. S. e ERNST, J. D. Suboptimal antigen presentation contributes to virulence of *M. tuberculosis* in vivo. **Journal of Immunology**, v. 196, n. 1, p. 357-364 2016.
- GRINGHUIS, S. I. et al. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. **Nature Immunology**, v. 10, p. 1081-1088, 2009.

- GROOTJANS, S.; BERGHE, T.V.; VANDENABEELE, P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. **Cell Death e Differentiation**, v. 24, n. 7, p. 1184-1195, 2017.
- GROVER, S. et al. The PGRS Domain of Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS Protein Rv0297 Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis through Toll-Like Receptor 4. **mBio**, v. 9, n. 3, p. e01017-18, 2018.
- GU, X. et al. MiR-23a-5p modulates mycobacterial survival and autophagy during mycobacterium tuberculosis infection through TLR2/MyD88/NF- κ B pathway by targeting TLR2. **Experimental cell research**, v. 354, n. 2, p. 71-77, 2017.
- GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting bcg and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. **Cell**, v. 119, p. 753-766, 2004b.
- HASSUNA, N. A. et al. Interleukin-18 and interferon- γ single nucleotide polymorphisms in Egyptian patients with tuberculosis. **PLoS One**, p. 1–11, 2021.
- HE, S. et al. Association of IL4, IL6, and IL10 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in a Tibetan Chinese population. **Oncotarget**, v. 9, p. 16418-16426, 2018.
- HIJIKATA, M. et al. Association of IFNGR2 gene polymorphisms with pulmonar tuberculosis among the Vietnamese. **Hum Genet**, v. 131, p. 675-682, 2012.
- HOSSEINI, R. et al. Efferocytosis and extrusion of leukocytes determine the progression of early mycobacterial pathogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 129, p. 3385-3395, 2016.
- KASSA, D. et al. Discriminative expression of whole blood genes in HIV patients with latent and active TB in Ethiopia. **Tuberculosis**, v. 100, p. 25-31, 2016.
- KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature reviews of immunology**, v.1, p. 20-30, 2001.
- KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, v. 407, p. 789-795, 2000.
- KUNDU, M. et al. A TNF-and c-Cbl-dependent FLIP S-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. **Nature immunology**, v. 10, n. 8, p. 918-926, 2009.
- LACHMANDAS, E. et al. Rewiring cellular metabolism via the AKT/mTOR pathway contributes to host defence against *Mycobacterium tuberculosis* in human and murine cells. **European Journal of Immunology**, v.46, p. 2574-2586, 2016.

- LAI, Y. M. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by BCG infection in cultured human bronchial airway epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 293, p. 393-401, 2007.
- LEE, H. K. et al. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. **Immunity**, v. 32, n. 2, p. 227-239, 2010.
- LEE, J. et al. Characterisation of genes differentially expressed in macrophages by virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis* through RNA-Seq analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4027, 2019.
- LI, F. et al. The defect in autophagy induction by clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* is correlated with poor tuberculosis outcomes. **Plos One**, v. 11, p. 1-12, 2016.
- LI, H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* PE13 (Rv1195) manipulates the host cell fate via p38-ERK-NF- κ B axis and apoptosis. **Apoptosis**, v. 21, n. 7, p. 795-808, 2016.
- LI, J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Mce3E Suppresses Host Innate Immune Responses by Targeting ERK1/2 Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 3756-3767, 2015.
- LIN, P. L. et al. Sterilization of granulomas is common in both active and latent tuberculosis despite extensive within-host variability in bacterial killing. **Nature Medicine**, v. 20, n. 1, p. 75-79, 2014.
- LIN, Y. et al. Identification of unique key genes and miRNAs in latent tuberculosis infection by network analysis. **Molecular Immunology**, v. 112, p. 103-114, 2019.
- LUBAHN, J. et al. Association of CASP8 D302H polymorphism with reduced risk of aggressive prostate carcinoma. **The Prostate**, v. 70, n. 6, p. 646-653, 2010.
- MACHICOTE, A. et al. Human CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells, Similarly to Classical CD4⁺Foxp3⁺ Cells, Suppress Immune Responses via PD-1/PD-L1 Axis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2788, 2018.
- MAHAMED, D. et al. Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. **Elife**, v. 6, e22028, 2017.
- MALIK, A. e Kanneganti, T-D. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. **Immunol Rev**, v. 281, p. 124-137, 2018.
- MANDAL, R. K. et al. A trial sequential meta-analysis of IFN- γ +874 A>T (rs2430561) gene polymorphism and extrapulmonary tuberculosis risk. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p.1-9, 2019.

- MANGTANI, P. et al. Protection by BCG against tuberculosis: a systematic review of randomised controlled trials. **Clinical Infectious Disease**, v. 58, n. 4, p. 470-480, 2013.
- MARTÍNEZ-NERI, P. A. et al. Prolactin modulates cytokine production induced by culture filtrate proteins of *M. bovis* through different signaling mechanisms in THP1 cells. **Cytokine**, v. 71, p. 38-44, 2015.
- MASTER, S. S. et al. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. **Cell host e microbe**, v. 3, n. 4, p. 224-232, 2008.
- MIHRET, A. et al. Combination of gene expression patterns in whole blood discriminate between tuberculosis infection states. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 1-9, 2014.
- MILANO, M. et al. Single nucleotide polymorphisms in *il17a* and *il6* are associated with decreased risk for pulmonary tuberculosis in Southern Brazilian Population. **Plos One**, v. 11, p. 1-11, 2016.
- MISHRA, B. B. et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1046-1063, 2010.
- MOHAREER, K.; ASALLA, S. e BANERJEE, S. Cell death at the cross roads of host-pathogen interaction in Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v. 113, p. 99–121, 2018.
- NEITEMEIER, S. et al. BID links ferroptosis to mitochondrial cell death pathways. **Redox Biology**, v. 12, p. 558-570, 2017.
- O'SULLIVAN, M. P. et al. A caspase-independent pathway mediates macrophage cell death in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infection and immunity**, v. 75, p. 1984-1993, 2007.
- OMS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2021**.
- OUIMET, M. et al. Mycobacterium tuberculosis induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism. **Nature immunology**, v. 17, n. 6, p. 677-686, 2016.
- PAGE, M. J. et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. **BMJ**, v. 372, 2021.
- PAJUELO, D. et al. NAD⁺ Depletion Triggers Macrophage Necroptosis, a Cell Death Pathway Exploited by Mycobacterium tuberculosis. **Cell Reports**, v. 24, n. 2, p. 429–440, 2018.

- PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. **Antioxidants e redox signaling**, v. 20, n. 3, p. 460-473, 2014.
- PERESI, E. et al. Cytokine polymorphisms, their influence and levels in brazilian patients with pulmonary tuberculosis during antituberculosis treatment. **Tuberculosis Research and Treatment**, p. 1-13, 2013.
- RAI, P. K. et al. A lipidated bi-epitope vaccine comprising of MHC-I and MHC-II binder peptides elicits protective CD4 T cell and CD8 T cell immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Translational Medicine*, v. 16, n. 279, 2018.
- RAVANAN, P.; SRIKUMAR, I. F.; TALWAR, P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. **Life sciences**, v. 188, p. 53-67, 2017.
- REKHA, R. S. et al. Phenylbutyrate induces LL-37-dependent autophagy and intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. **Autophagy**, v. 11, n. 9, p. 1688-1699, 2015.
- REMIJSEN, Q. et al. Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. **Cell death e disease**, v. 5, n. 1, p. e1004-e1004, 2014.
- ROCA, F. J.; RAMAKRISHNAN, L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 521-534, 2013.
- ROMERO, M. M. et al. Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-11, 2012.
- SAINI, N. K. et al. Suppression of autophagy and antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS47. **Nature microbiology**, v. 1, n. 9, p. 1-12, 2016.
- SALUM, K. C. R. et al. Interleukin 1 α and 1 β gene variations are associated with tuberculosis in silica exposed subjects. **American Journal of Industrial Medicine**, p. 1-11, 2019.
- SECHER, T. et al. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 7855-7864, 2009.

SHA, S. et al. Mycobacterium tuberculosis Rv1987 protein induces M2 polarization of macrophages through activating the PI3K/Akt1/mTOR signaling pathway.

Immunology and Cell Biology, 2021.

SHAMSI, M.; ZOLFAGHARI, M. R.; FARNIA, P. Association of ifn- γ and p2x7 receptor gene polymorphisms in susceptibility to tuberculosis among iranian patients.

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, v. 63, p. 93-101, 2016.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 660-665, 2015.

SINGH, N.; HASSAN, A. e BOSE, K. Molecular basis of death effector domain chain assembly and its role in caspase-8 activation. **The FASEB Journal**, v. 30, p. 186-200, 2016.

SOHN, H. et al. Induction of cell death in human macrophages by a highly virulent Korean Isolate of Mycobacterium tuberculosis and the virulent strain H37Rv.

Scandinavian journal of immunology, v. 69, n. 1, p. 43-50, 2009.

SONGANE, M. et al. Polymorphisms in Autophagy Genes and Susceptibility to Tuberculosis. **Plos One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

STUTZ, M. D. et al. Is receptor-interacting protein kinase 3 a viable therapeutic target for Mycobacterium tuberculosis infection?. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1178, 2018.

SU, H. et al. Recombinant Lipoprotein Rv1016c Derived from Mycobacterium tuberculosis Is a TLR-2 Ligand that Induces Macrophages Apoptosis and Inhibits MHC II Antigen Processing. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 147, 2016.

SUELA, S. P. et al. CASP8 D302H polymorphism delays the age of onset of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers. **Breast cancer research and treatment**, v. 119, n. 1, p. 87-93, 2010.

TAYPE, C. A. et al. Genetic susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 495-504, 2010.

THADA, S. et al. Polymorphisms of IFN- γ (+874A/T) and IL-12 (+1188A/C) in tuberculosis patients and their household contacts in Hyderabad, India **American Journal Respiratory Critical Care**, v. 77, p. 559-565, 2016.

THUONG, N. T. T et al. Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 12, p. e1000229, 2008.

- UPADHYAY, S.; MITTAL, E. e PHILIPS, A. Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. **Pathogens and Disease**, v. 76, 2018.
- WANCHU, A. et al. Caspase 1 and caspase 8 in HIV infected patients with and without tuberculosis. **Journal of Postgraduate, Medicine**, v. 50, p. 98-101, 2004.
- WANG, L. et al. Mycobacterium tuberculosis Lipoprotein MPT83 Induces Apoptosis of Infected Macrophages by Activating the TLR2/p38/COX-2 Signaling Pathway, *The Journal of Immunology*, v. 198, p. 4772-4780, 2017.
- WANG, X. et al. AKT1 polymorphisms are associated with tuberculosis in the Chinese population. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, p. 97-101, 2010.
- WATSON, R. O. et al. The cytosolic sensor cGAS detects Mycobacterium tuberculosis DNA to induce type I interferons and activate autophagy. **Cell host e microbe**, v. 17, n. 6, p. 811-819, 2015.
- WEISS, G.; SHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological Reviews**, v. 264, n.1, p. 182–203, 2015.
- WELIN, A. et al. Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing M. tuberculosis undergo caspase-1-and cathepsin B-independent necrosis. **PLoS one**, v. 6, n. 5, p. e20302, 2011.
- WINAU, F. et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 105-117, 2006.
- WU, S. et al. Evaluation of TLR2, TLR4, and TOLLIP polymorphisms for their role in tuberculosis susceptibility. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, v. 126, p. 501-508, 2018.
- WU, S. et al. Genetic polymorphisms of IL1B, IL6, and TNF- α in a Chinese Han population with pulmonary tuberculosis. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2018.
- WU, S. et al. Polymorphisms of cytokine genes and tuberculosis in two independent studies. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 2019.
- WU, S. et al. Polymorphisms of TLR2, TLR4 and TOLLIP and tuberculosis in two independent studies. **Bioscience Reports**, p. 1-10, 2020.
- YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. et al. Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and the HLA-DRB1 locus in Mexican Mestizo patients with ulcerative colitis. **Immunology letters**, v. 95, n. 1, p. 31-35, 2004.

YANTI, B. et al. The role of *Mycobacterium tuberculosis* complex species on apoptosis and necroptosis state of macrophages derived from active pulmonary tuberculosis patients. **BMC Research Notes**, v. 13, p. 1-7, 2020.

YIM, J. J; SELVARAJ, P. Genetic susceptibility in tuberculosis. **Respirology**, v. 15, n. 2, p. 241-256, 2010.

YOULE, R. J. e STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **molecular cell biology**, v. 9, p. 47-59, 2008.

ZHANG, Q. et al. Antimycobacterial and anti-inflammatory mechanisms of baicalin via induced autophagy in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2142, 2017.

ZHANG, Y. et al. DHX36, BAX, and ARPC1B May Be Critical for the Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. **Canadian Respiratory Journal**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

ZHOU, Y. et al. P2X7 receptor in spinal tuberculosis: Gene polymorphisms and protein levels in Chinese Han population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, p. 138-144, 2018.

ZHOU, Y. et al., Virulent *Mycobacterium bovis* Beijing Strain Activates the NLRP7 Inflammasome in THP-1 Macrophages. **PLOS ONE**
DOI:10.1371/journal.pone.0152853 April 4, 2016.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1. Genes envolvidos nas vias de morte encontrados nas bases de dados de anotações gênicas e suas interseções.

Via	Bases de dados	nº de genes	Genes (símbolos)
Apoptose			
	Keeg/Bioplanet - Metascape - Wikipathway	36	TRAF2; DFFB; FASLG; BID; BNIP3; CASP9; BBC3; BCL2L11; CFLAR; MAP3K5; TNFRSF1A; APAF1; XIAP; BIRC5; AKT2; TNFRSF6B; CASP10; BCL2L10; TNFSF10; TNFRSF10A; MAP2K4; CDKN2A; MAPK8; BCL2L1; TNFRSF1B; GZMB; TNFRSF21; BAX; TNFRSF10B; MCL1; BLK; NFRSF10D; PAK2; BCL2A1; BCL2L14; MMP9
	Keeg/Bioplanet - Metascape	18	VDR; PTEN; CDK5; TP53AIP1; ATF3; STK17A; SOD1; SFRP4; FOXC1; PIK3CB; TOP2A; CXCR2; BCL10; RHOH; C2; CD40LG; CASP8AP2; TP53BP2
	Keeg/Bioplanet - Wikipathway	60	IL7R; IRF4; HSPB1; IGF1; MAPK14; CCL5; TP53; BMF; TNF; RAF1; RELB; MAP3K7; BAK1; CDKN1A; CASP6; NFKBIE; BIK; BNIP3L; AKT1; CASP1; MAPK1; HRK; IGF2; PIK3CG; MDM2; NFKB1; NQO1; BAD; BAG3; FADD; FAS; CDKN1B; NFKBIA; BCL2; CASP7; TNFRSF11B; IRF5; LTA; CASP4; IGF1R; TRAF3; RIPK1; CASP2; MYC; THBS1; JUN; CASP8; MAPK10; DAXX; BCL2L2; PTPN13; CCL2; RELA; TP73; IL6; TP63; RIPK2; IRF2; CASP3; BIRC3

Keeg/Bioplanet 208

MMP2; PLCE1; XCL1; PRKCE; TLR4; YY1;
 LEPR; ZAP70; ABCD3; RGS2; TNIK; GSR;
 IL10RA; HSD17B1; CXCR4; WT1; CYP19A1;
 CDC27;
 MKI67; TGFB2; IL4R; VCAM1; RGS5; IDO1;
 ABCG2; CDK6; REL; CARD9; NOS2;
 SLC11A2; CAPN3; LOX; MSLN; SOD2; TNC;
 PPP1R16B; IL1A; GADD45G; PLA2G4A;
 CCR6; LDLR; MAX; BRCA2; HLA-B; ALOX5;
 SELP; GSTZ1; HMGN1; NLRP3; NAMPT;
 CYP1A2; CSF3; DAD1; ITGA3; PRKAR1A;
 BRCA1; HSPA6; IL10; RFWD2; CCR5;
 NFKBIL1; TLR1;
 SPP1; CD80; BARD1; F2; RAC2; ALOX5AP;
 PDCD5; MTHFR; IFNGR2; RASGRP1;
 PTGS2; ARG1; SNRPB; EGFR; RAD23B;
 IL1B; MFAP1; IL18; OXA1L; CCND1; CAPN2;
 CYP2E1;
 PIK3CA; LGALS1; MAOA; IL12B; ADORA1;
 S100B; IL15; IL2; ATM; BCL11A; ESR1;
 TCF7; CREB1; ERBB2; ORM1; IL17RB;
 CDK4; TXN; CDH1; IGFBP3; IFNG; BECN1;
 MCM5;
 LGALS8; IL4; CHEK1; IL15RA; SNCA;
 IL1RAP; IFNAR2; KPNB1; HSD3B2; CX3CR1;
 CD69; CXCL12; IFNB1; GAPDH; APC; BCL6;
 AICDA; XRCC6; VEGFA; XRCC1; HLA-DRA;
 GPX1; AKAP9; TLR6; TNFSF8; PSME2; IL3;
 TGFB1; ITGA2; APEX1; SERPINA3; ICAM1;
 CYP1A1; IRAK4; CD40; ATP2A2; MED16;
 CCNA2; PDXK; TSC2; AR; CDC45; NRIP1;
 BNIP2; NME1; IL5; KRAS; ERAP1; IL13;
 CD86; CDK7; MBD2; BAG1; HNRNPA1;
 AKT3; TNFAIP3; DAPK1; CHEK2; TERT;
 CAPN9; HIF1A; HSPA8; PRKCA; SHMT1;
 MCM4; CCND3; IFNA21; TNFRSF11A;

IGFBP5; GSTP1; IL1RL1; IL7; RB1; CYP4B1;
 CYP1B1; ATP2B1; EGR1; PTPN2; CCR7;
 IL5RA; PERP; SELE; ERCC2; ABCB1; CCNH;
 IL1RN; KLHL24; PPP3CC; PIM1; CSF2;
 ITPR3; KLF6; RAD17; PARP1; NR3C1;
 CD3G; CDKN1C; IQGAP2; CDC25A;
 MAP2K6; OPRM1

Metascape	28	MTOR; RNF186; TRAIL; GSDME; LEP; DATF1; CASP14; PD-1; ZC3HC1; C4; TNFR2; IL8RB; CIDEC; SST; NAA38; Bcl211; FRAP1; TNFSF15; RAG1; ARHGEF2; E2F3; C4A; ATG3; LTBR; MAP3K9; BCL7C; E2F2; XRCC2
Wikipathway	5	RNF7; SQSTM1; ITGB4; GSK3B; VAV3

Autofagia

Bioplanet - Keeg - Metascape - Wikipathway	11	ULK2; ATG7; ATG3; ULK1; ATG13; PIK3C3; ATG12; RB1CC1; LAMP2; ATG4A; GABARAPL1
Bioplanet - Keeg - Metascape	2	ATG4B; ATG4C
Bioplanet - Keeg - Wikipathway	17	ATG5; MTOR; MLST8; LAMP1; BECN1; MAPK1; BCL2; PRKAA2; SQSTM1; PTEN; RAF1; AMBRA1; IGF1R; GABARAP; ATG16L1; ATG10; UVRAG

	Keeg - Metascape - Wikipathway	3	WIPI1; ATG9B; TSC2
	Bioplanet - Wikipathway	26	IL6ST; MAP1LC3B; CDKN1B; CDC25B; IFNG; BRAF; GSK3B; IGF1; MAPK14; TP53; IRF5; IGFBP5; IFNB1; IL6; TNFSF15; RB1; MMP14; MDM2; CDKN2A; IL3; TGFB1; IL1A; IL1B; THBS1; CDKN1A; JUN
	Keeg - Metascape	2	ATG2A; ATG2B
	Keeg - Wikipathway	3	RPTOR; ATG16L2; TSC1
	Bioplanet	10	IFNA4; IFNA5; IFNA17; IFNA14; IFNA21; IFNA16; ULK3; IFNA13; IFNA8; IFNA7
	Keeg	20	KRAS; CFLAR; AKT1; IRS2; VAMP8; AKT3; DAPK1; BNIP3; HIF1A; PIK3CB; AKT2; MAPK8; MAP3K7; IRS1; MRAS; BAD; BCL2L1; PIK3CA; MTMR3; MAPK10
	Metascape	6	BCL2L11; DAPL1; BID; HSPA8; TMEM150B; TSPO
	Wikipathway	2	PCNA; IGFBP3
Outras vias	Keeg - Metascape	4	IL1A; BCL2; BIRC3; FAS

Keeg	46	TRAF2; IFNA4; TLR4; IFNG; IFNA5; CFLAR; MAPK8; JAK2; RIPK1; IFNA17; TNFSF10; BAX; TYK2; TNFRSF1A; FASLG; IL1B; TNFAIP3; IFNA13; STAT3; CASP1; IFNA8; BID; TNFRSF10B; PLA2G4A; IFNA7; TNFRSF10A; IFNA14; CAPN2; SQSTM1; IFNAR2; XIAP; STAT5B; IFNA21; JAK3; IFNGR1; CASP8; PARP1; NLRP3; IFNGR2; MAPK10; FADD; JAK1; IFNB1; RNF31; IFNA16; TNF
Metascape	13	DATF1; MAP3K9; CASP4; LAMP1; TNFRSF6B; CASP2; GSDMB; GPAM; BCL7C; TNFRSF10D; GSDME; TP53AIP1; NAA38

Tabela suplementar 2. Lista de genes identificados para “Outras vias de morte” encontrados nas bases de dados de anotações gênicas.

Via	Bases de dados	nº de genes	Genes (símbolos)
Necrose	Wikipathway	8	MAPK8; TNFRSF1A; TNF; FADD; RIPK1; PLA2G4A; PARP1; CASP8
Necroptose	Metascape	3	BIRC3; CASP4; FAS

	Keeg	50	TRAF2; IFNA4; TLR4; IFNG; IFNA5; CFLAR; MAPK8; JAK2; RIPK1; IFNA17; TNFSF10; BAX; IL1A; TYK2; TNFRSF1A; FASLG; IL1B; TNFAIP3; IFNA13; STAT3; CASP1; IFNA8; BID; TNFRSF10B; PLA2G4A; BCL2; IFNA7; TNFRSF10A; IFNA14; CAPN2; SQSTM1; IFNAR2; XIAP; STAT5B; IFNA21; BIRC3; JAK3; IFNGR1; CASP8; PARP1; NLRP3; IFNGR2; MAPK10; FADD; JAK1; IFNB1; FAS; RNF31; IFNA16; TNF
Piroptose	Metascape	3	CASP4; GSDMB; GSDME
Morte celular	Bioplanet	2	MAPK8; SQSTM1
Morte celular programada	Metascape	13	BCL2; BCL7C; BIRC3; CASP2; DATF1; GPAM; IL1A; LAMP1; MAP3K9; NAA38; TNFRSF10D; TNFRSF6B; TP53AIP1

Tabela suplementar 3. Detalhamento dos scores de interação gênica por parâmetro considerado e score combinado para cada interação. São apresentados apenas os scores classificados entre alto (0.700) e muito alto (>0.900).

Gene 1	Gene 2	Vizinhança genômica	Fusão gênica	Co-ocorrência	Homologia	Co-expressão	Interação experimental	Anotação em banco de dados	Busca automática	Score combinado
CASP8	TNFRSF1A	0	0	0	0	0.063	0.476	0.900	0.990	0.999
CASP8	FADD	0	0	0	0	0.062	0.999	0.900	0.996	0.999
FADD	TNFRSF1A	0	0	0	0	0.062	0.758	0.900	0.989	0.999
TNF	TNFRSF1A	0	0	0	0	0.062	0.994	0.900	0.994	0.999
BAX	BID	0	0	0	0	0	0.901	0.900	0.857	0.998
BAX	BCL2	0	0	0	0.645	0	0.981	0.900	0.758	0.998
IFNAR2	IFNB1	0	0	0	0	0	0.270	0.900	0.986	0.998
IL1B	IL6	0	0	0	0	0.427	0	0.900	0.953	0.997

FADD	TNF	0	0	0	0	0	0.345	0.900	0.952	0.996
BAD	BCL2	0	0	0	0	0	0.905	0.900	0.559	0.995
IFNG	IFNGR2	0	0	0	0	0	0.847	0.800	0.862	0.995
IL1A	IL1B	0	0	0	0	0.761	0	0.800	0.916	0.995
AKT1	BAD	0	0	0	0	0.080	0.884	0.900	0.566	0.994
BID	CASP8	0	0	0	0	0.062	0.683	0.900	0.838	0.994
IL6	TNF	0	0	0	0	0.125	0	0.900	0.941	0.994
IL1A	IL6	0	0	0	0	0.376	0	0.900	0.910	0.993
AKT1	RAF1	0	0	0	0.581	0	0.880	0.900	0.914	0.992
BAD	RAF1	0	0	0	0	0	0.876	0.900	0.259	0.990
IL6	TGFB1	0	0	0	0	0.065	0	0.900	0.901	0.990

BCL2	BID	0	0	0	0	0	0.900	0.800	0.507	0.989
CASP8	TNF	0	0	0	0	0.062	0.282	0.900	0.868	0.989
MAPK1	RAF1	0	0	0	0.587	0.066	0.846	0.900	0.738	0.989
BID	FADD	0	0	0	0	0.063	0.676	0.900	0.614	0.986
IL1B	TNF	0	0	0	0	0.462	0	0.500	0.942	0.983
MAPK1	MAPK14	0	0	0.412	0.926	0.106	0.874	0.800	0.776	0.977
CASP8	IL1B	0	0	0	0	0.063	0.182	0.900	0.715	0.975
MAPK14	TNF	0	0	0	0	0	0	0.900	0.768	0.975
AKT1	AKT2	0	0	0.446	0.981	0.065	0.741	0.900	0.891	0.974
BAD	MAPK8	0	0	0	0	0	0.682	0.900	0.244	0.973
IL1B	MAPK14	0	0	0	0	0	0	0.900	0.734	0.972

IL1A	TNF	0	0	0	0	0.289	0	0.500	0.917	0.968
CASP8	MAPK1	0	0	0	0	0	0.282	0.900	0.532	0.963
MAPK1	CASP8	0	0	0	0	0	0.282	0.900	0.532	0.963
IFNA8	IFNAR2	0	0	0	0	0	0.463	0.900	0.294	0.958
BCL2	MAPK8	0	0	0	0	0	0.471	0.900	0.258	0.957
IL6	MAPK1	0	0	0	0	0	0	0.900	0.589	0.957
AKT1	MAPK14	0	0	0.303	0.623	0.083	0.830	0.600	0.769	0.956
BID	TNFRSF1A	0	0	0	0	0	0.287	0.900	0.427	0.955
BCL2	MAPK1	0	0	0	0	0	0.462	0.900	0.222	0.954
BAX	MAPK8	0	0	0	0	0	0.281	0.900	0.394	0.952
IFNAR2	IFNGR2	0	0	0	0	0.080	0	0.800	0.749	0.950

IFNB1	TLR4	0	0	0	0	0	0	0	0.948	0.948
IFNA17	IFNAR2	0	0	0	0	0	0	0.900	0.479	0.945
IFNA21	IFNAR2	0	0	0	0	0	0	0.900	0.481	0.945
AKT1	BCL2	0	0	0	0	0.062	0	0.900	0.457	0.944
IFNG	IL6	0	0	0	0	0.066	0	0	0.942	0.943
IL6	TLR4	0	0	0	0	0.081	0	0	0.937	0.940
IFNG	TNF	0	0	0	0	0.152	0.213	0	0.915	0.938
MAPK1	TGFB1	0	0	0	0	0.049	0.058	0.900	0.381	0.937
BID	TNF	0	0	0	0	0	0.102	0.900	0.352	0.936
IFNA4	IFNAR2	0	0	0	0	0	0	0.900	0.345	0.931
MAPK1	MAPK8	0	0	0.386	0.886	0.081	0.225	0.900	0.735	0.931

TLR4	TNF	0	0	0	0	0.083	0	0	0.925	0.929
AKT3	BAD	0	0	0	0	0.062	0.146	0.900	0.217	0.928
IL1B	TLR4	0	0	0	0	0.160	0	0	0.917	0.927
AKT2	BAD	0	0	0	0	0.062	0.146	0.900	0.181	0.925
IFNA16	IFNAR2	0	0	0	0	0	0	0.900	0.286	0.925
IFNA14	IFNAR2	0	0	0	0	0	0	0.900	0.244	0.921
BAD	MAPK1	0	0	0	0	0.062	0	0.900	0.169	0.915
IFNA7	IFNAR2	0	0	0	0	0	0	0.900	0.150	0.911
IFNG	IL1B	0	0	0	0	0.080	0	0	0.903	0.907
BAD	MAPK10	0	0	0	0	0	0	0.900	0.093	0.905
MAPK10	MAPK8	0	0	0.445	0.984	0.062	0	0.900	0.917	0.904

AKT1	MAPK1	0	0	0.304	0.592	0.068	0.148	0.800	0.795	0.895
AKT2	MAPK1	0	0	0.336	0.591	0.077	0.148	0.800	0.621	0.887
IFNAR2	IFNG	0	0	0	0	0	0	0.800	0.457	0.886
BID	MAPK8	0	0	0	0	0	0.287	0.800	0.246	0.883
BCL2	RAF1	0	0	0	0	0	0.865	0	0.162	0.882
AKT3	MAPK1	0	0	0.313	0.602	0.066	0.148	0.800	0.584	0.881
BAD	BID	0	0	0	0	0	0	0.650	0.661	0.876
IFNB1	TNF	0	0	0	0	0.107	0	0	0.847	0.858
IFNB1	IL6	0	0	0	0	0.101	0	0	0.840	0.850
CASP8	TLR4	0	0	0	0	0.062	0.070	0.600	0.612	0.846
BAD	BAX	0	0	0	0	0	0.535	0	0.681	0.845

IL1A	TLR4	0	0	0	0	0.062	0	0	0.841	0.844
AKT2	RAF1	0	0	0	0.585	0.062	0.057	0.800	0.454	0.842
AKT3	RAF1	0	0	0	0.590	0	0.057	0.800	0.497	0.841
BCL2	CASP8	0	0	0	0	0	0.726	0	0.432	0.838
IL1B	TNFRSF1A	0	0	0	0	0.062	0	0	0.833	0.837
AKT2	BCL2	0	0	0	0	0.053	0	0.800	0.197	0.834
AKT1	IL6	0	0	0	0	0.056	0	0	0.829	0.832
AKT1	TNF	0	0	0	0	0	0.056	0	0.826	0.829
AKT1	AKT3	0	0	0.445	0.981	0	0.130	0.800	0.808	0.822
IFNB1	IFNGR2	0	0	0	0	0	0.153	0.600	0.507	0.818
IFNB1	IL1B	0	0	0	0	0.084	0	0	0.807	0.816

AKT2	AKT3	0	0	0.444	0.979	0.063	0.057	0.800	0.928	0.813
AKT3	BCL2	0	0	0	0	0.062	0	0.800	0.085	0.813
BCL2	MAPK10	0	0	0	0	0	0.056	0.800	0.083	0.811
BID	MAPK10	0	0	0	0	0	0	0.800	0.098	0.811
IFNB1	IFNG	0	0	0	0	0.083	0	0	0.796	0.806
MAPK14	MAPK8	0	0	0.396	0.924	0.066	0.470	0.600	0.814	0.803
IFNA5	IFNAR2	0	0	0	0	0	0.213	0.600	0.413	0.799
IFNG	TLR4	0	0	0	0	0	0	0	0.798	0.798
BAX	CASP8	0	0	0	0	0	0.374	0	0.688	0.796
FADD	TLR4	0	0	0	0	0	0.056	0.600	0.504	0.796
TGFB1	TNF	0	0	0	0	0.090	0	0	0.784	0.796

IFNAR2	IL6	0	0	0	0	0	0	0.600	0.498	0.790
IL1B	TGFB1	0	0	0	0	0.087	0	0	0.775	0.786
IFNA4	IFNA8	0	0	0	0.978	0.077	0.683	0.300	0.642	0.780
IFNG	TGFB1	0	0	0	0	0	0	0	0.780	0.780
AKT1	IL1B	0	0	0	0	0	0.056	0	0.774	0.777
IFNA14	IFNA5	0	0	0	0.981	0.076	0.758	0	0.683	0.769
IFNG	IL1A	0	0	0	0	0	0	0	0.768	0.768
AKT1	CASP8	0	0	0	0	0	0.063	0	0.760	0.766
AKT1	BAX	0	0	0	0	0.061	0.270	0	0.682	0.763
AKT2	MAPK14	0	0	0.332	0.633	0.110	0.148	0.600	0.540	0.763
IL6	MAPK14	0	0	0	0	0	0	0	0.758	0.758

IFNGR2	IL6	0	0	0	0	0	0	0.600	0.391	0.745
AKT1	TLR4	0	0	0	0	0.063	0.168	0	0.696	0.742
AKT3	MAPK14	0	0	0.343	0.635	0.065	0.148	0.600	0.458	0.742
IL6	TNFRSF1A	0	0	0	0	0	0	0	0.740	0.740
IFNA4	IFNA5	0	0	0	0.981	0.083	0.723	0	0.710	0.738
IFNA17	IFNGR2	0	0	0	0	0	0	0.600	0.357	0.731
IFNA21	IFNGR2	0	0	0	0	0	0	0.600	0.357	0.731
IFNA13	IFNA8	0	0	0	0.974	0.088	0.708	0	0.601	0.726
IFNA14	IFNA21	0	0	0	0.979	0.076	0.602	0.300	0.608	0.723
CASP8	MAPK8	0	0	0	0	0	0.287	0	0.624	0.720
IFNG	LAMP1	0	0	0	0	0	0	0	0.713	0.713

CASP8	IL6	0	0	0	0	0.062	0	0	0.699	0.706
LAMP1	TNF	0	0	0	0	0	0	0	0.704	0.704
MAPK8	TLR4	0	0	0	0	0	0.097	0	0.684	0.703
IFNA13	IFNAR2	0	0	0	0	0	0	0.600	0.282	0.700
MAPK8	TNF	0	0	0	0	0.052	0	0	0.696	0.700

8.2. CAPÍTULO 02: MANUSCRITO

Dinâmica de ativação de linfócitos T em pacientes com Tuberculose Latente, Tuberculose Pulmonar Ativa e coinfectados TB-HIV.

SANTANA CC¹, DANTAS PS¹, MOTA SM¹, OLIVEIRA, GS¹, ROCHA MS¹, TIBÚRCIO R¹, BARRETO-DUARTE B¹, SILVEIRA-MATOS PA¹, CHAVES ARB¹, PINA ICA¹, SILVA MO¹, MARINHO JM¹, CONCEIÇÃO EL¹, WEYENBERGH JV², ANDRADE BB, BARBOSA T.¹

¹Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz Bahia. ²Katholieke Universiteit Leuven (Bélgica).

Autor correspondente: theolis.bessa@fiocruz.com.br

RESUMO

A resposta imunológica à Tuberculose envolve mecanismos relacionados à resposta imune inata e à adaptativa. Além da contribuição de macrófagos, a atividade de linfócitos T é essencial para a eliminação da micobactéria e manutenção da estrutura do granuloma. Contudo, a atividade citotóxica e a cronificação dos estímulos pró-inflamatórios podem levar ao dano ao tecido no hospedeiro. A compreensão dos padrões de ativação e exaustão de linfócitos T observados na doença, pode auxiliar no entendimento dos diferentes espectros clínicos vistos na TB. Neste trabalho, investigamos o perfil de diferenciação, ativação e exaustão de linfócitos com LTBI, TB e TB-HIV, buscando assinaturas celulares que possam contribuir para o conhecimento sobre a resposta imune diferencial observada nesses grupos. Nossos resultados indicam haver diferenças no padrão de ativação celular em LTBI, TB e TB-HIV, em parte determinada pela tendência inversa da presença de células T HLA-DR⁺PD-1⁺ em relação às CD95⁺. Em TB-HIV observou-se maior presença de células de memória central e efetora, e células T_{cm} CD8⁺HLA-DR⁺ demonstraram serem capazes de discriminar os indivíduos coinfectados dos demais grupos clínicos investigados. Nossos resultados estão de acordo com a noção de que há padrões distintos de ativação e resposta nas diferentes formas clínicas da TB.

Palavras-chave: ativação de linfócitos, tuberculose, coinfeção TB-HIV, T CD8 de memória central.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é a doença de etiologia bacteriana mais mortal e apenas deixou o status de doença infecciosa que mais mata a partir da eclosão da COVID-19, pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, no início de 2020 (OMS, 2021). A TB apresenta um largo espectro de apresentações clínicas relacionadas a fatores do hospedeiro e da micobactéria, e sua disseminação e progressão são influenciadas por fatores ambientais e sociais (OMS, 2021; MONGA et al., 2017; LODDENKEMPER; LIPMAN; ZUMLA, 2016; ROWIŃSKA-ZAKRZEWSKA et al., 2016).

A maior parcela indivíduos que entram em contato com o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) desenvolve uma resposta imunológica eficiente, que promove a contenção do bacilo e inibe a manifestação sintomática da doença (CADENA; FORTUNE e FLYNN, 2017). Esses indivíduos podem eliminar a micobactéria, porém mais frequentemente mantêm a replicação do bacilo controlada, um estado clínico conhecido como tuberculose latente (LTBI). Apenas uma pequena parcela dos infectados, entre 5 e 10%, evoluirão para a forma ativa (OMS, 2021; CADENA; FORTUNE e FLYNN, 2017; LIN e FLYN, 2015; O’GARRA et al., 2013). Grande parte da dificuldade de se manejar os casos de LTBI e de se compreender as variáveis imunológicas envolvidas na progressão da doença é atribuída a esta variabilidade de apresentações nos indivíduos infectados (SANCHES; CARVALHO; DUARTE, 2015; GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2011; LIN et al., 2009; PETO et al., 2009).

A coinfeção com o vírus HIV (TB-HIV) é um dos principais fatores de agravamento do quadro da TB, aumentando o risco de evolução para doença ativa e o risco de óbito. Nessa condição estão associadas a falha do sistema imune inato e a depleção/disfunção das células T CD4⁺, que resultam em maior risco de transição da infecção tuberculosa latente para a forma ativa da doença (AHMED; RAKSHIT e VYAKARNAM, 2016). Os indivíduos coinfectados com HIV apresentam diminuição de células CD4⁺ periféricas, resultando em desequilíbrio da razão T CD4⁺/T CD8⁺, diminuição do número de células T CD4⁺ e da secreção de IFN- γ e TNF no granuloma,

aumento do número de neutrófilos e secreção de IL-10, e aumento da carga bacilar (DRIERICH et al., 2016).

A coinfeção TB-HIV também contribui para a pior progressão mesmo em casos em que a contagem de CD4 mantém-se preservada (BELL e NOURSADEGHI, 2018), sugerindo que, somada ao decréscimo na quantidade, a funcionalidade das células possa interferir na reativação da TB.

A destruição dos linfócitos T CD4⁺ é um dos fatores que prejudica a diferenciação das células T CD8⁺ em linfócitos T citotóxicos (CTL) capazes de eliminar os macrófagos infectados. A falha da resposta de CTL é usada como um mecanismo de evasão pelos patógenos para evitar a morte das células infectadas e alguns estudos têm demonstrado que a maturação e ativação das CTLs são fundamentais na eliminação tanto de células infectadas com *M. tuberculosis* como também pelo HIV (SHAO et al., 2016; NDHLOVU et al., 2015).

Em uma infecção, a expansão de clones de células T efetoras responsivas ao patógeno é sustentada pela contínua ativação a partir do pool de células naive que reconhecem os antígenos específicos do invasor e principalmente pela proliferação de clones responsivos em diferentes estágios de diferenciação, nos órgãos linfoides secundários e no sítio de infecção. Essas células são distinguidas em linfócitos de memória central e efetora, apresentam diferentes características fenotípicas e subpopulações e podem ser afetadas diferencialmente na infecção crônica (HOPE et al., 2019). Ainda, pouco está esclarecido sobre como ocorre essa modulação da resposta do hospedeiro frente ao Mtb e o HIV, individualmente ou simultaneamente, bem como o papel das diferentes subpopulações celulares na contenção dos patógenos ou na imunopatogênese.

Neste trabalho, buscamos caracterizar o estado de ativação e expansão dos subcompartimentos de células T no sangue periférico de pacientes LTBI, TB e TB-HIV, buscando diferenciar padrões de resposta possivelmente associados à progressão da doença nesses indivíduos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupos clínicos:

Tuberculose Latente (LTBI), Tuberculose Pulmonar Ativa (TB) e Coinfectados com TB-HIV (TB-HIV).

Aspectos éticos

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisas do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz sob o registro CAAE 21823713.8.0000.0040, Protocolo CEP-CPqGM/Fiocruz n° 350/2011 e todas as avaliações clínicas foram conduzidas sob os princípios éticos constantes na Declaração de Helsink.

Os pacientes voluntários deste estudo foram informados sobre todos os procedimentos realizados e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os participantes ou seus responsáveis legais e permanecem sob a guarda da instituição onde as análises foram realizadas.

População de estudo

Foram recrutados pacientes atendidos no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM-SESAB), recém-diagnosticados com tuberculose, antes do início do tratamento e que realizaram teste para coinfeção com o HIV, pacientes atendidos no Centro Estadual Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa (CEDAP-SESAB) ou no Serviço Municipal de Assistência Especializada – SEMAE – diagnosticados com HIV, que foram submetidos a investigação de coinfeção com tuberculose; e voluntários sadios infectados com TB em infecção latente (LTBI), diagnosticada por prova tuberculínica (intradermorreação com enduração igual ou superior a 10 mm após 48-72h) ou reconhecimento específico de antígenos de *M. tuberculosis* detectado por ensaio de liberação de interferon-gamma - IGRA (Quantiferon TB-GOLD test, Qiagen, CA).

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idades entre 18 e 60 anos e sem histórico de abandono do tratamento.

Reagentes

Avaliação da frequência e perfil funcional de linfócitos T nas amostras dos pacientes

Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com tuberculose latente (LTBI), tuberculose ativa (TB) e coinfectados TB-HIV foram mantidas criopreservadas para análise por citometria de fluxo. A fenotipagem para distinção dos subconjuntos celulares e seu perfil de ativação foi realizada por imunomarcção,

utilizando anticorpos conjugados a fluorocromos, para reconhecimento de moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD45RO, CCR7, CD25, HLA-DR, CD279/PD-1, CD95/FAS) seguida de fixação, permeabilização celular e imunomarcação de granzima B intracelular. A análise foi realizada em citômetro de fluxo BD LSFortessa, com aquisição mínima de 5.000 eventos.

Análises estatísticas

Sexo e proporções de diferentes perfis celulares foram comparados entre os grupos de estudo utilizando o teste exato de Fisher. Idade e massa corpórea (BMI) foram comparadas usando o teste *U* Mann-Whitney. Os valores de *p* foram ajustados usando o método de Holm-Bonferroni e considerados estatisticamente significantes quando < 0.05 .

A distribuição dos diferentes perfis de células T foi avaliada por análise de componentes principais e análise não supervisionada de agrupamento hierárquico usando o método de Ward. Nesta última análise, os dendrogramas representam a distância euclidiana (inferindo grau de similaridade). Os valores foram normalizados pelo método do Z-score. Para calcular as alterações nas dobras, os controles foram usados conforme indicado.

A avaliação da sensibilidade e especificidade da proporção de células Tcm CD8⁺HLA-DR⁺ em distinguir os grupos clínicos avaliados foi realizada a partir da Curva Característica de Operação do Receptor (ROC) e a precisão geral do marcador foi avaliada pelo cálculo da Área Sob a Curva (AUC).

Análises de hierarquização e das diferenças no perfil celular dos pacientes foram realizadas no programa R. Os heatmaps foram elaborados utilizando o pacote "ComplexHeatmap" e as análises de componentes principais utilizando o pacote "Factoextra". Os gráficos de dispersão e de setores foram confeccionados no Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc). Os diagramas de Venn foram confeccionados a partir de comparações feitas entre as frequências celulares para cada grupo clínico utilizando a ferramenta Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). As análises da imunomarcação em citometria de fluxo, foi realizada com auxílio do software FlowJo™ (Becton, Dickinson & Company).

RESULTADOS

Para avaliação da dinâmica de ativação de linfócitos em indivíduos/pacientes com infecção latente (LTBI), monoinfecção ativa (TB) e coinfectados (TB-HIV), uma análise não supervisionada da frequência de linfócitos T expressando diferentes marcadores de ativação obtidos. Utilizamos os marcadores HLA-DR e CD25 para ativação celular, granzima B (GRZB) para atividade citotóxica e PD-1 e CD95 para exaustão.

Com base nesta análise identificamos 4 diferentes agrupamentos hierárquicos (Figura 1A). Estes perfis distinguem-se principalmente em relação à proporção de indivíduos TB-HIV, comparada à proporção dos LTBI; à proporção de indivíduos do sexo feminino, em comparação à proporção de indivíduos do sexo masculino, e quanto à razão entre as proporções de células T CD4 e CD8.

Os Grupos A e B apresentam o maior grau de heterogeneidade em relação aos grupos clínicos. Embora muito semelhantes no quesito de reduzidas frequências de linfócitos exaustos e CD4 ativados, eles diferem principalmente na magnitude da razão CD4/CD8. O grupamento C é majoritariamente composto por indivíduos LTBI, elevados níveis de exaustão celular e baixa frequência de células citotóxicas. Por fim, o grupo D, o mais homogêneo dos clusters em relação aos grupos clínicos, é caracterizado por reduzida frequência de CD4 total. Além disso, pode-se notar que o grupo D é composto por 2 subgrupos que diferem no perfil de células exaustas e citotóxicas.

Os clusters A e C apresentam uma predominância de indivíduos pertencentes ao grupo LTBI e do sexo feminino, enquanto o cluster D é composto unicamente por indivíduos coinfectados, dos quais, apenas um pertence ao sexo feminino. Além disso, neste mesmo agrupamento hierárquico, a razão CD4/CD8 é a mais baixa (Figura 1A, figura suplementar 1 A, B, E). O cluster B, apresenta proporções equilibradas de indivíduos dos três grupos clínicos avaliados, bem como em relação ao sexo. A maioria dos pacientes TB está neste grupo. O grupo C caracteriza-se por reunir tanto indivíduos TB-HIV como indivíduos LTBI, de ambos os sexos, porém com razão de CD4/CD8 pouco menor que a encontrada para o grupo A.

Em relação à hierarquização dos subtipos celulares, há marcante distinção entre o cluster D e os demais grupos, quando se compara as proporções de células T CD4⁺. Neste cluster de indivíduos coinfectados com HIV, a frequência destes linfócitos é reduzida quando comparado com os demais clusters. Destaca-se ainda as

subpopulações CD4⁺HLA-DR⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺GRZB⁺ e CD4⁺CD95⁺, além das proporções de células T CD8⁺ expressando PD-1, CD95, HLA-DR e GRZB, como importantes elementos para a distinção entre os grupos.

O cluster A apresenta maior proporção de células T CD4⁺, associado a baixa proporção de células T CD8⁺, porém com proporções aumentadas de CD8⁺GRZB⁺. A proporção de T CD4⁺ expressando GRZB também é elevada na maioria dos indivíduos deste grupo. Em metade dos indivíduos deste grupo, que são LTBI, ocorrem proporções diminuídas de T CD4⁺ e de T CD8⁺ expressando PD-1, coincidente com baixa proporção de células T CD4⁺ expressando HLA-DR e elevada proporção de células T CD4⁺ expressando CD95.

No cluster B, verificamos indivíduos LTBI com perfil semelhante ao descrito acima, porém nestes a proporção de células T CD8⁺ CD95⁺ é elevada, há menor proporção de células expressando GRZB⁺ e maior proporção de células T CD8⁺, especialmente expressando HLA-DR. Pacientes LTBI do grupo B assemelham-se aos indivíduos TB do mesmo grupo na elevada proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando CD95, na baixa proporção de células T de ambas as linhagens expressando PD-1 e na baixa proporção de células T CD4⁺ expressando HLA-DR. A expressão de GRZB tanto em células T CD4⁺ como CD8⁺ é maior nos indivíduos TB.

No cluster C, os indivíduos LTBI mantêm proporções elevadas de células T CD4⁺ e baixas proporções de células T CD8⁺, especialmente baixa proporção de células T CD8⁺ expressando CD95, aspectos em que se assemelham aos pacientes LTBI do grupo A, porém com baixa proporção de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ expressando GRZB, aproximando-se dos LTBI do grupo B. Os indivíduos LTBI do grupo C distinguem-se marcadamente dos demais LTBI pela elevada proporção de células T expressando PD-1 tanto entre CD4⁺ como CD8⁺, elevada proporção de células T expressando HLA-DR entre as CD4⁺ e baixa proporção de células expressando CD95 também entre as CD4⁺. O perfil dos indivíduos LTBI do grupo C assemelha-se bastante ao perfil dos indivíduos TB-HIV deste mesmo grupo, exceto pela menor proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos TB-HIV, em paralelo com proporções superiores de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando GRZB e células T CD4⁺ expressando CD95.

O cluster D caracteriza-se por uma menor proporção de células T CD4⁺, que o distingue dos demais grupos. No cluster D, temos dois perfis de indivíduos TB-HIV. Um deles assemelha-se ao perfil dos TB-HIV no grupo C, com elevada exaustão

celular de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e proporção elevada de células T CD4⁺ ativadas, porém nestes indivíduos a proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando GRZB é menor. No outro perfil, há elevada proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando GRZB, bem como de células T CD4⁺ expressando CD95. Porém, em comparação com os indivíduos TB-HIV do grupo C, a proporção de células T CD8⁺ é mais elevada e a proporção de células CD4⁺ expressando HLA-DR é reduzida. A proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando PD-1 é mais baixa nos indivíduos deste perfil em comparação com os indivíduos TB-HIV do grupo C.

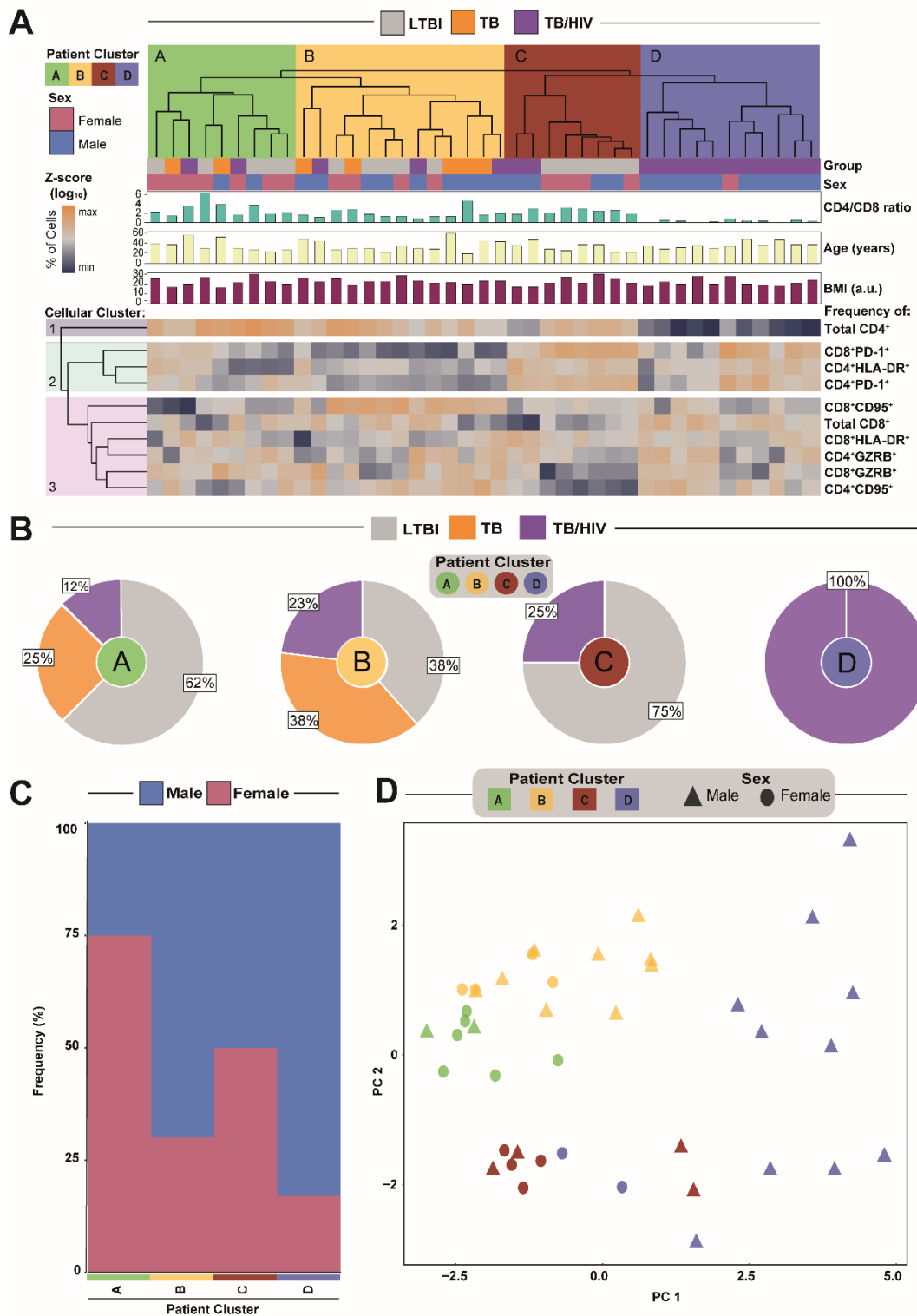


Figure 1- Dynamics of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes activation in Tuberculosis patients.

A) a heatmap was designed to depict the overall activation profile of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells among Latent tuberculosis (LTBI), active pulmonary TB (TB), and HIV co-infected individuals (TB/HIV), based on \log_{10} of cell positivity for each marker. A hierarchical cluster analysis was conducted to identify endotypes. **B)** Pie charts represent the frequencies of groups (LTBI, TB and TB-HIV) in the corresponding fractions of each patient cluster. **C)** Stacked bar plot depicts the overall proportion of males and females in each endotype. **D)** Principal component analysis distinguishes patients based on biological sex and endotype classification.

Não foram encontradas diferenças entre os grupos clínicos avaliados quanto ao índice de massa corporal ou idade (Figura suplementar 1 C, D), entretanto, como esperado, uma razão CD4/CD8 significativamente menor em relação aos demais clusters foi encontrada para o cluster D, onde predominam pacientes coinfetados. Esse achado está relacionado a uma menor presença de células T CD4⁺ observada neste grupo (Figura suplementar 1 A, E).

Ainda considerando a análise da presença de marcadores de superfície de linfócitos T, agora nos grupos clínicos avaliados, observamos que, indivíduos TB-HIV apresentam maiores níveis de células T CD4⁺ expressando CD95, GRZB, HLA-DR e PD-1 em relação a indivíduos LTBI e de células T CD4⁺GRZB⁺ e CD4⁺PD-1⁺ em relação a pacientes TB. Comparando os indivíduos monoinfetados com TB com LTBI, encontramos diferenças apenas nas proporções de CD4⁺CD95⁺. Em T CD8⁺, o grupo TB-HIV apresentou maiores proporções de células expressando CD95, GRZB e HLA-DR na comparação aos indivíduos LTBI (Fig 2).

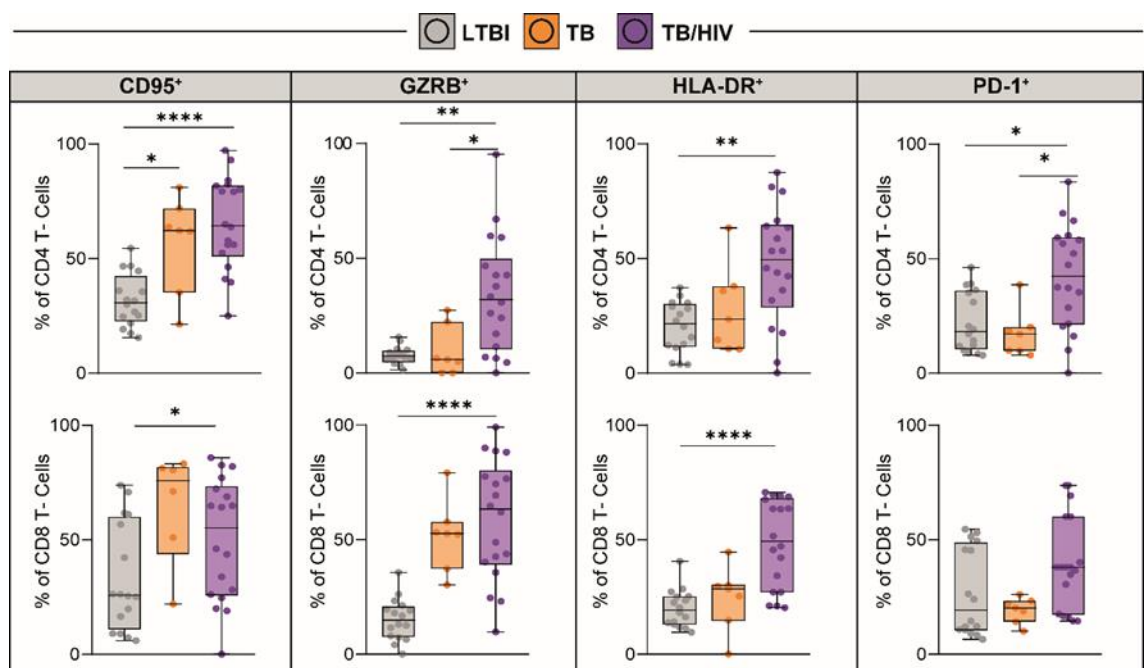


Figure 2- Patterns of T lymphocyte activation. Boxplots represent the frequencies of CD4 and CD8 T cells expressing the markers. Data were analyzed using the Mann-Whitney test or Wilcoxon matched-pairs test for paired analyses within each study group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

O perfil de presença dos marcadores de ativação e exaustão analisados nas populações de linfócitos dos grupos clínicos estudados, sugere um padrão distinto de frequência de células ativadas e exauridas em T CD4⁺ e T CD8⁺. Este perfil foi corroborado por análise de componentes principais, que indicou uma distinção dos indivíduos coinfectados em relação aos demais grupos. Esse distanciamento é marcado principalmente pela proporção de células T CD4⁺, e na análise dos subconjuntos celulares, pela proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando PD-1, HLA-DR, GRZB e CD95 (figura suplementar 2).

Observamos maiores proporções de células T de memória central tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ entre os indivíduos TB-HIV em comparação com os LTBI, aliada a menor proporção de células efetoras. Na análise de similaridade, CD4 determinou proximidade entre os grupos latentes e coinfectados quanto às proporções das células de memória. O perfil dos linfócitos T CD8⁺ no grupo LTBI apresentou maior similaridade com o perfil encontrado no grupo de monoinfectados com TB.

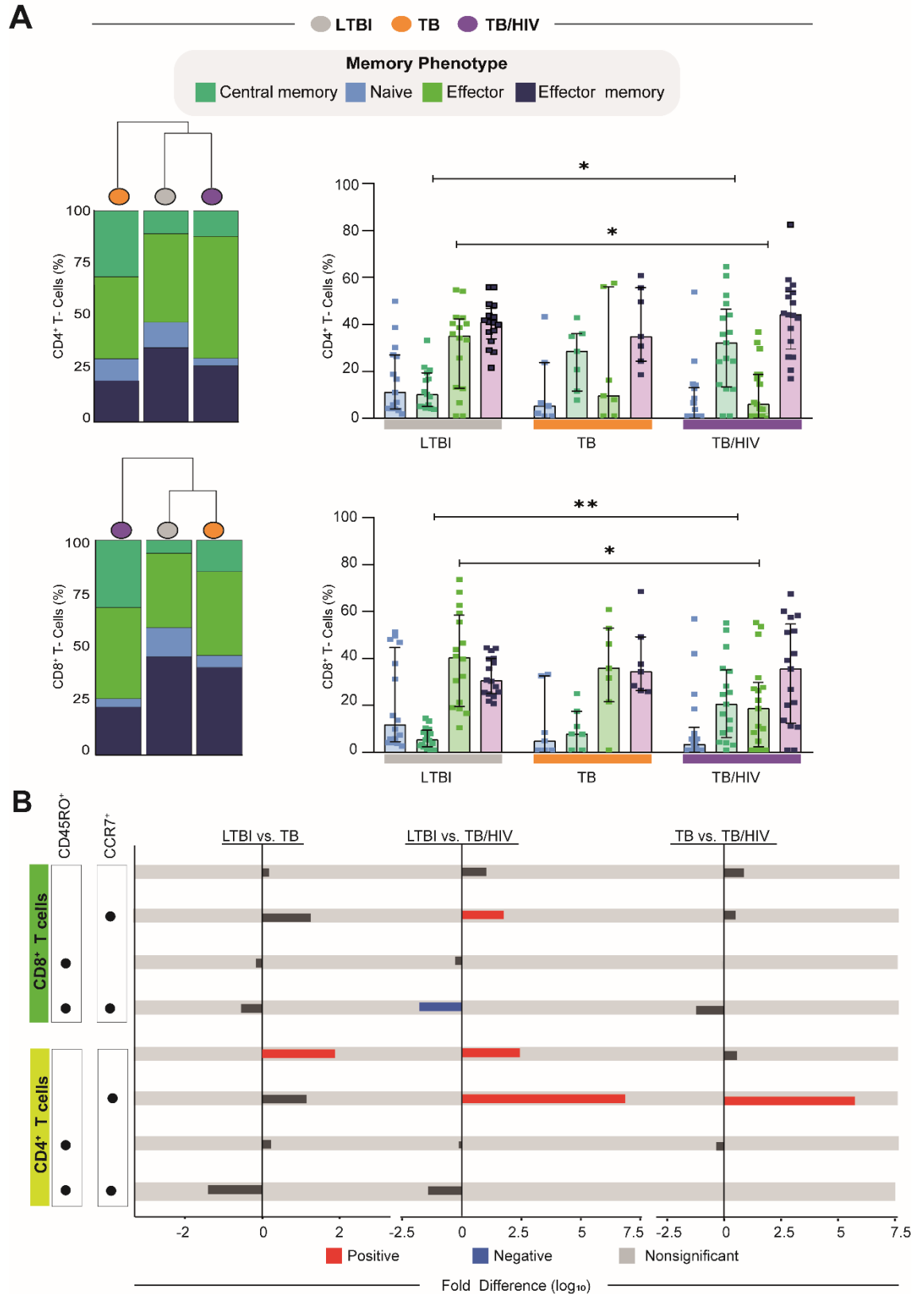


Figure 3- Memory compartments in T lymphocytes from Tuberculosis patients. A) A hierarchical cluster analysis was employed to assess the similarities among clinical groups regarding of memory CD4 and CD8 T cell frequencies. Dendrograms represent Euclidean distance. Left panels display hierarchical clusters and frequencies while right bar plots depict

the frequencies of each memory subset among the clinical groups. B) Fold-differences in the levels of memory T cell populations between the study groups. Data were analyzed using the Mann-Whitney test or Wilcoxon matched-pairs test for paired analyses within each study group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$).

Analizamos posteriormente o perfil das populações celulares de memória, em comparação com as células T ativadas e naive, nos diferentes grupos clínicos estudados. Observamos uma proporção em torno de 2 vezes menor de células de memória central no compartimento de células T CD8⁺ em LTBI, quando comparados com TB-HIV. Por outro lado, a proporção de células T CD4⁺ efetoras foi maior em LTBI do que em TB ou TB-HIV (2 e 2,5 vezes, respectivamente), bem como a proporção de células naive 7,5 vezes maior na comparação LTBI vs. TB-HIV e em torno de 5 vezes superior em TB comparado aos coinfectados (Fig 3B).

A seguir, verificamos o perfil geral de ativação das células T dos grupos clínicos estudados analisando as subpopulações Tcm, Tem, Tef e naive. Podemos observar que os grupos apresentam diferentes proporções dos marcadores de ativação e exaustão dentre os compartimentos celulares.

Nesta análise, o grupo LTBI apresenta dois padrões distintos de expressão destas moléculas, que os distancia hierarquicamente. Em um deles notamos uma maior proporção de PD-1 e HLA-DR e uma menor proporção de células positivas para CD95 em todos os compartimentos de CD4 quanto de CD8, os assemelhando aos indivíduos LTBI que compõem os clusters A e C apresentados na figura 1. Ainda, notamos que, dentre os compartimentos de CD4, apenas as células naive não apresentaram aumento na proporção de células CD25⁺, ao passo que uma redução na proporção de GRZB não ocorreu de forma significativa apenas em células efetoras, achado este também muito semelhante ao encontrado para os LTBI presentes no cluster C.

O segundo grupo de LTBI, de forma contrária ao encontrado para o primeiro, apresenta elevada proporção de CD95 em todos os compartimentos celulares de CD4 e este marcador apenas não se mostra elevado em naives de CD8. Nota-se também a presença reduzida de células HLA-DR⁺ e PD-1⁺. As proporções apresentadas aproximam os indivíduos LTBI deste grupo daqueles presentes no cluster B, entretanto, quanto à presença de células positivas para GRZB, que se mostra elevada especialmente nos compartimentos de CD4, mas também em naives e Tem de CD8, os valores são semelhantes aos encontrados para os LTBI do cluster A.

Para os indivíduos coinfectados temos também dois perfis distintos. Em geral, não somente os marcadores de ativação, mas também aqueles relacionados ao perfil de exaustão, estão mais representados. Os perfis se diferenciam nesta análise quanto à marcação para PD-1 no compartimento de memória central de células T CD4⁺ e CD8⁺, e no compartimento de células T CD8⁺ naive. A proporção de células T CD4⁺ de memória central expressando HLA-DR também apresentou maior proporção entre os indivíduos coinfectados de um dos perfis, na comparação com todos os demais grupos. Da mesma forma, observa-se diferenças entre os dois perfis quanto à expressão de CD25 entre as células T CD8⁺ de memória central. Comparando os compartimentos celulares, verificamos que há proporções diminuídas tanto em células T CD4⁺ como T CD8⁺ de memória central expressando HLA-DR em indivíduos LTBI do último grupo, mas perfis opostos entre células T CD4 (que estão em proporções aumentadas) e T CD8 (que estão menos representadas) no primeiro grupo.

Nesta análise, observamos novamente o perfil dos indivíduos do grupo TB disperso em vários clusters. Em geral, o perfil aproxima-se de um padrão intermediário entre LTBI e TB-HIV, quanto às proporções observadas de células T de memória central tanto de T CD4⁺ quanto de T CD8⁺ expressando HLA-DR e PD-1. Já nos demais compartimentos de células T CD8⁺, evidencia-se a proporção reduzida de células positivas para estas moléculas, além de menor frequência células Tem e efetoras CD4⁺ expressando PD-1.

Em análise comparativa considerando apenas os grupos clínicos estudados, as proporções encontradas para os marcadores demonstraram haver maior similaridade dos indivíduos coinfectados aos LTBI descritos aqui no primeiro grupo (LTBI 1), especialmente quando comparadas as proporções dos marcadores no compartimento de CD8. A ocorrência de um perfil semelhante entre parte dos indivíduos LTBI e parte dos indivíduos coinfectados, distinguindo-os dos demais indivíduos analisados, é destacada na análise de componentes principais (Figura 4B).

Ao avaliar as proporções de células expressando os marcadores destacados nos diferentes compartimentos celulares, observamos cinco grupos separados pela análise hierárquica. No primeiro agrupamento observamos principalmente as células T de memória central CD4⁺ e CD8⁺ com marcação para GRZB e HLA-DR, além de PD-1 para TCD4⁺ e CD25 para T CD8⁺. No segundo grupo estão compreendidos alguns subcompartimentos de T CD4⁺ e T CD8⁺, com predominância de marcação para CD95. Já no terceiro grupo estão mais representados os perfis de células T naive,

e no quarto grupo distinguimos um subgrupo de células T de memória efetora que separa os grupos em dois perfis: um composto pelo primeiro perfil de LTBI e indivíduos coinfectados e outro formado majoritariamente pela soma dos indivíduos do grupo TB e LTBI 2. Neste cluster encontra-se também a maior parte dos compartimentos de T CD8⁺ quanto à marcação para PD-1. O quinto e último grupo, compreende células T CD4⁺ dos diferentes compartimentos analisados, com predominância de células naive e efectoras.

No primeiro agrupamento celular observamos uma menor positividade para marcadores de ativação CD25, HLA-DR e GRZB entre os indivíduos latentes, de forma mais marcante em T CD8⁺ de LTBI 2, entretanto, menor proporção destas células também é percebida em T CD4⁺. Nesse cluster, parte do grupo dos coinfectados apresenta proporções maiores de todos os marcadores listados, enquanto os demais integrantes deste grupo contêm menores percentuais de células positivas para estes marcadores. Além disso, o grupo TB demonstra um padrão intermediário dentre os grupos estudados, com tendência à proximidade com LTBI 2.

No segundo grupamento, há uma contribuição de células Tem, Tcm e Tef de CD8⁺ e CD4⁺, com predominância de marcação para CD95⁺ e GRZB⁺. Aqui, novamente notamos dois perfis distintos para os indivíduos LTBI, um com proporções reduzidas para ambos os marcadores (LTBI 1) e outro com padrões aumentados destas moléculas (LTBI 2). De uma forma geral, os indivíduos coinfectados apresentaram elevada positividade para as células delimitadas neste cluster, enquanto, mais uma vez, os indivíduos mono infectados com TB apresentam padrão intermediário, com tendência a proporções menores destas células.

No terceiro cluster desta hierarquização, onde predominam células naive, mais uma vez observamos um padrão de marcação mais semelhante entre os indivíduos LTBI 1 e os coinfectados, direcionado pela menor presença de células CD25⁺, CD95⁺ e GRZB⁺. Estas marcações são mais elevadas em TB e LTBI 2.

O quarto grupo, distingue-se hierarquicamente pelas proporções dos diferentes subconjuntos celulares, apresenta principalmente células T CD8⁺ de diferentes subcompartimentos. Nele, ao analisar as células de memória efetora positivamente marcadas para HLA-DR e PD-1, notam-se elevadas proporções de células positivas dentre os indivíduos LTBI 1 e coinfectados e valores reduzidos em TB e LTBI 2. Um padrão semelhante é observado para as outras populações celulares que contribuem para a formação deste agrupamento, contudo, a marcação de PD-1 em Tcm, Tef e

naives em T CD8⁺ e Tef de T CD4⁺, assim como aquelas apresentadas no primeiro cluster (CD25, HLA-DR e GRZB), aparentemente separa os indivíduos coinfectados em dois perfis distintos: um com maior presença destas células (TB-HIV 1) e outro com valores reduzidos (TB-HIV 2), este último mais próximo de LTBI 2 e TB.

Por fim, no último grupamento, composto apenas por subpopulações de linfócitos T CD4⁺, observa-se um padrão mais próximo entre os indivíduos LTBI dos dois perfis observados quanto às células Tcm, Tem e Tef positivas para CD25, embora diverjam quanto à positividade para HLA-DR e PD-1 entre as células naive e efetoras, onde LTBI 2 apresenta proporções pouco menores destas moléculas. Ainda, os indivíduos coinfectados apresentam tendência de menor positividade para todos os marcadores apresentados neste cluster.

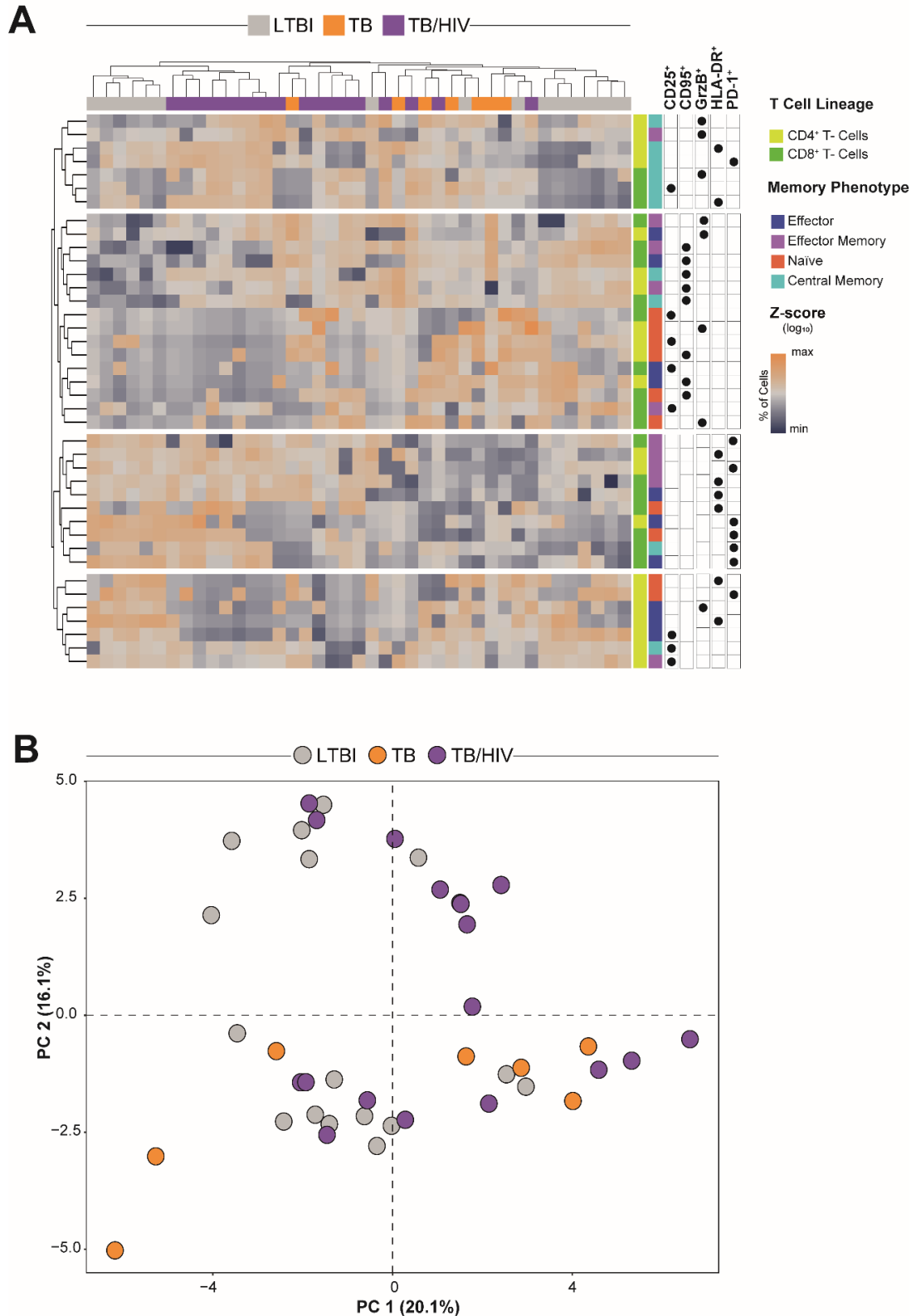


Figure 4- The dynamics of activation in memory T cell populations. A) a heatmap was designed to depict the overall activation profile of both CD4⁺ and CD8⁺ memory T cell populations among Latent tuberculosis (LTBI), active pulmonary TB (TB), and HIV co-infected individuals (TB/HIV), based on log₁₀ of cell positivity for each marker. B) This result was confirmed by a principal component analysis.

Comparando a proporção de células T CD95⁺ e PD-1⁺ em células T CD4⁺ e CD8⁺, vemos que esses tipos celulares seguem o mesmo padrão nos compartimentos de memória central e de memória efetora, para todos os grupos clínicos estudados. Neles, percebe-se que há uma tendência inversa entre esses marcadores, onde nos grupos em que as proporções de PD-1 mostram-se elevadas (LTBI 1 e TB-HIV 1) os valores de CD95 estão reduzidos, sendo o contrário igualmente verdadeiro. Também notamos padrão de comportamento similar para a presença de GRZB nas células naives e de memória efetora de T CD4⁺ e CD8⁺ nos grupos avaliados.

Em resumo, com base nas análises dos compartimentos celulares apresentados anteriormente, verificamos existência de perfis celulares diferentes tanto dentro do grupo LTBI quanto em TB-HIV. Enquanto o grupo aqui denominado LTBI 1 apresenta perfil celular mais próximo de TB-HIV 1, o segundo grupo LTBI (LTBI 2) mostra-se mais próximo de TB-HIV 2. A aproximação desses grupos é determinada principalmente pela presença de HLA-DR, PD-1 e CD95, onde, de forma geral, nota-se um aumento de HLA-DR e PD-1 e redução de CD95 em LTBI 1 e TB-HIV 1 em todos os compartimentos celulares, enquanto o inverso é observado em LTBI 2 e TB-HIV 2 (Fig. 5 A - D, diagramas à esquerda). O grupo TB, embora apresente de forma geral um padrão intermediário entre esses grupos, demonstra perfil mais próximo daquele formado por LTBI 2 e TB-HIV 2, com especial similaridade ao LTBI 2 em todos os compartimentos analisados (Fig. 5 A - D, diagramas à direita).

A partir dos dados obtidos, buscamos identificar se algum subtipo celular poderia configurar um parâmetro de distinção entre os grupos clínicos estudados. Com base nos dados apresentados até aqui, identificamos o subcompartimento de memória central, destacando-se a proporção de células positivas para HLA-DR tanto entre células T CD4⁺ como CD8⁺, e GRZB e CD25 entre as células T CD8⁺ como os possíveis perfis celulares capazes de tal distinção.

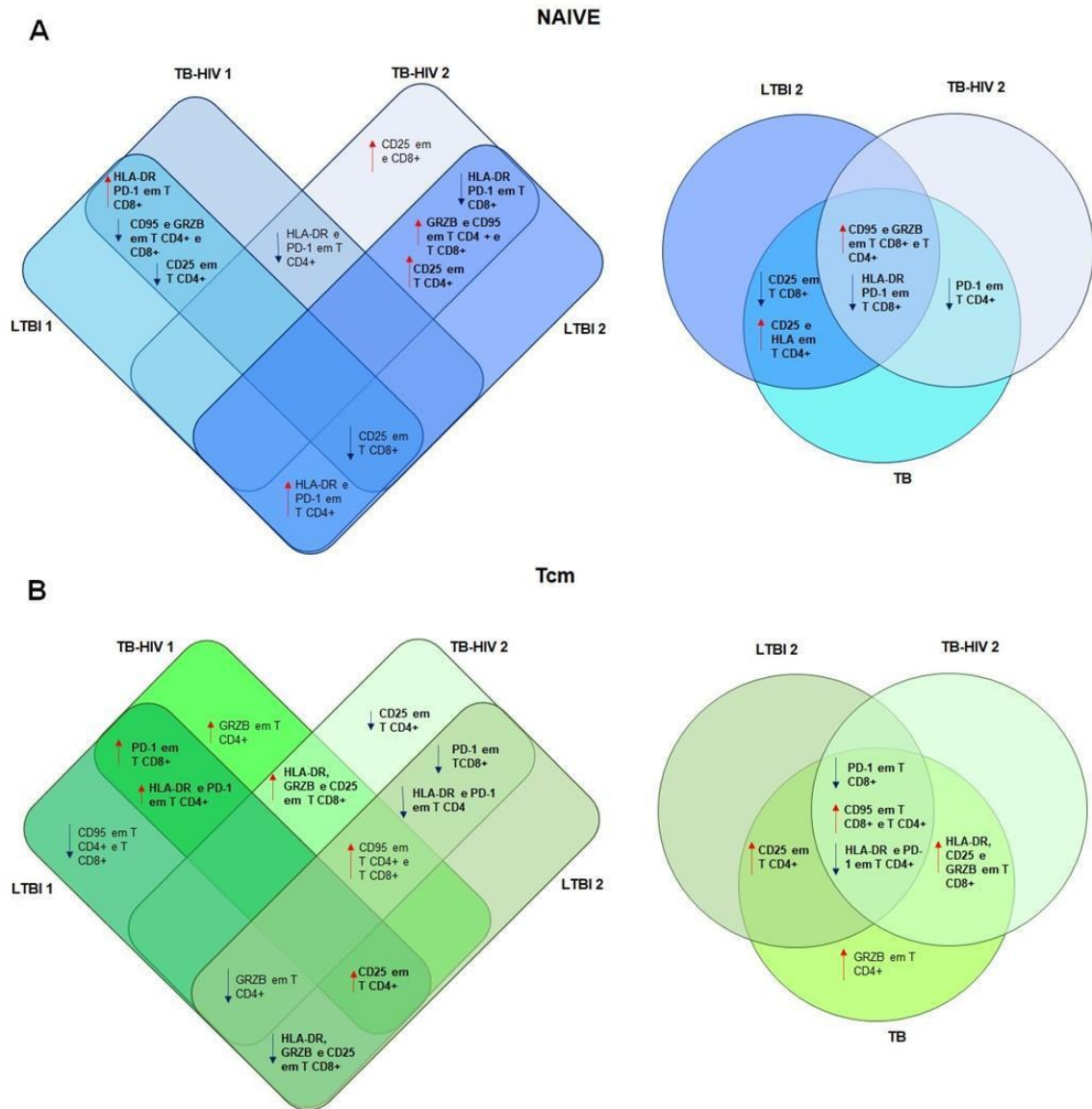


Figura 5. Similaridades no perfil de expressão de moléculas de ativação e exaustão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com tuberculose latente, tuberculose ativa e coinfetados com TB-HIV. Diagramas baseados nas frequências das células observadas nas análises de clusterização. Os diagramas à esquerda representam as intersecções entre os diferentes perfis de LTBI e TB-HIV e os diagramas à direita as intersecções evidenciadas para o grupo TB. **A** - células naive; **B** - células de memória central.



Figura 5 (continuação) Similaridades no perfil de expressão de moléculas de ativação e exaustão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com tuberculose latente, tuberculose ativa e coinfectados com TB-HIV. Diagramas baseados nas frequências das células observadas nas análises de clusterização. Os diagramas à esquerda representam as intersecções entre os diferentes perfis de LTBI e TB-HIV e os diagramas à direita as intersecções evidenciadas para o grupo TB. **C** - células de memória efetora; **D** - células de efetoras.

Por análise de árvore de decisão, obtivemos resultados que demonstram ser possível discriminar, de forma eficaz, cerca de dois terços dos indivíduos coinfectados com base no limiar de 62% frequência de HLA-DR no compartimento de Tcm em T CD8⁺. Os indivíduos coinfectados apresentam elevada proporção de células Tcm CD8⁺HLA-DR⁺, em relação aos demais pacientes (Fig. 6A). Este achado foi confirmado por análise em curva ROC, onde verificamos que é possível distinguir

principalmente os indivíduos LTBI dos indivíduos coinfetados com base na proporção de células Tcm CD8⁺HLA-DR⁺, porém há menor utilidade deste marcador para distinguir indivíduos com LTBI dos indivíduos com TB (Fig. 6B).

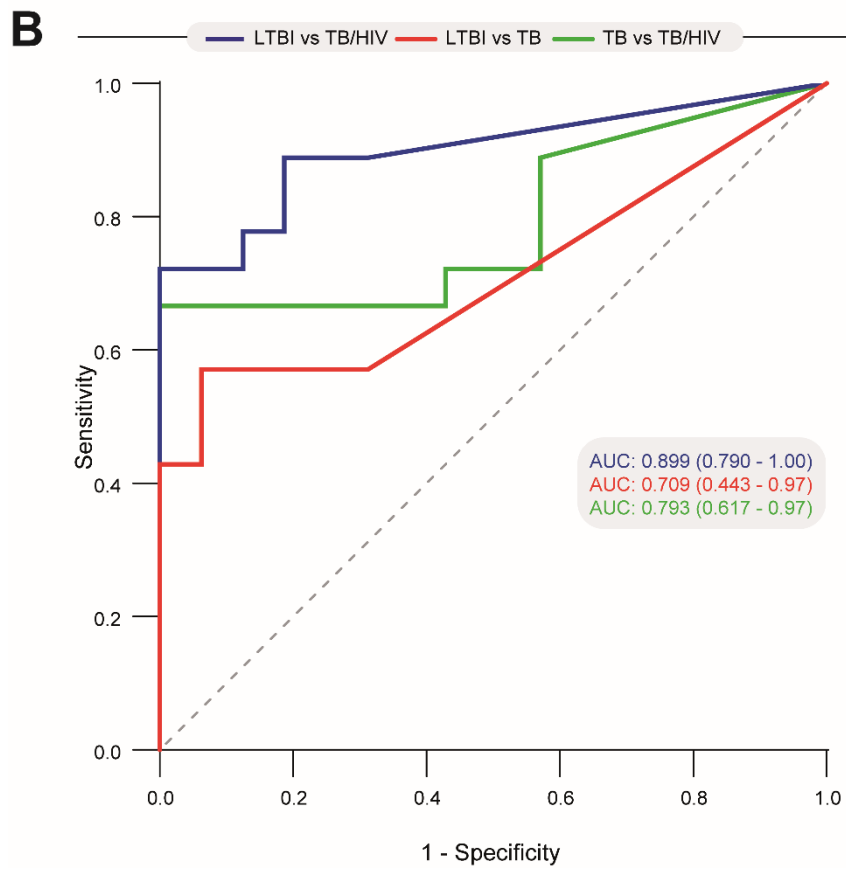
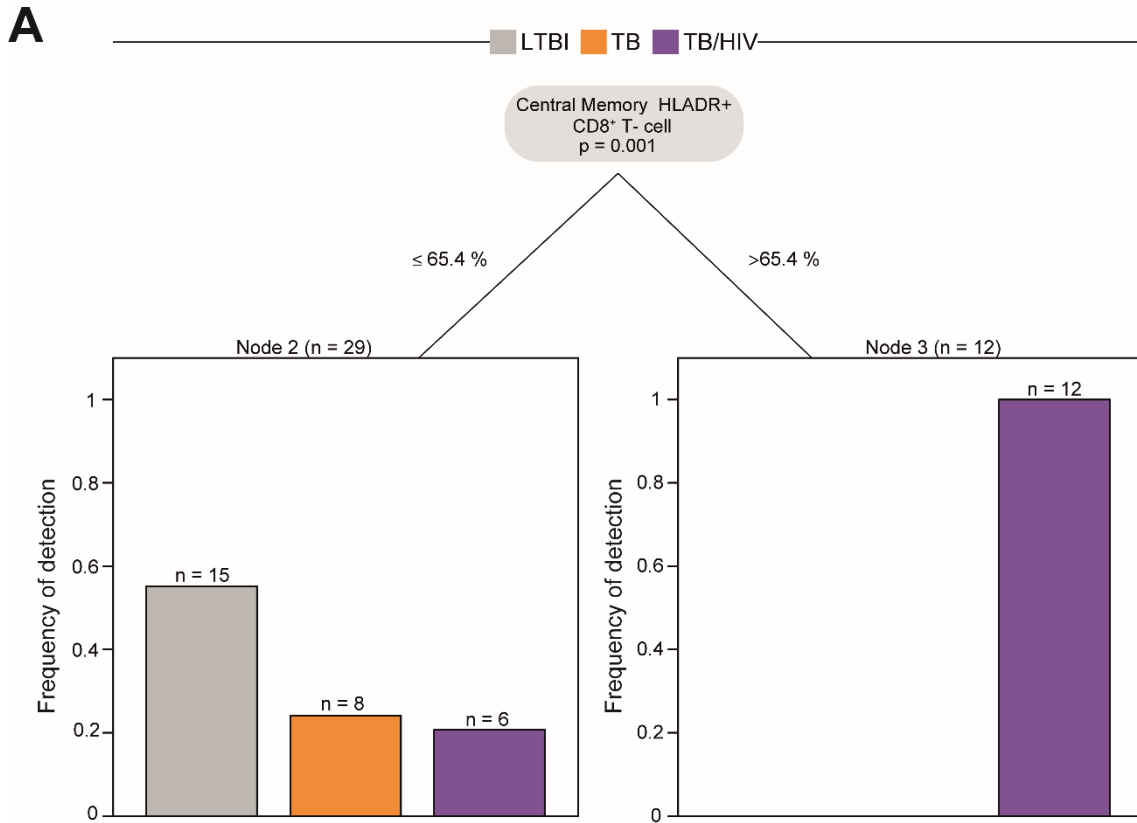
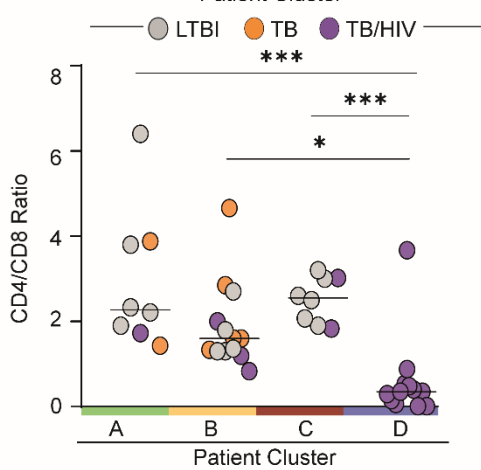
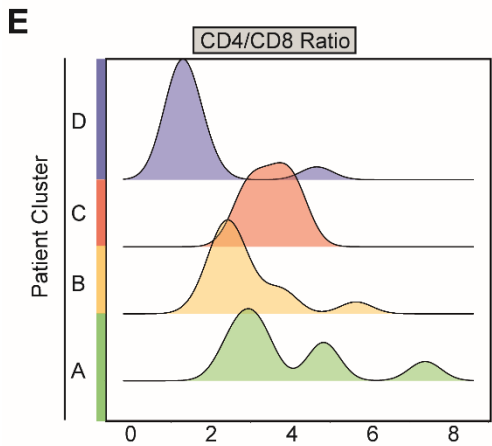
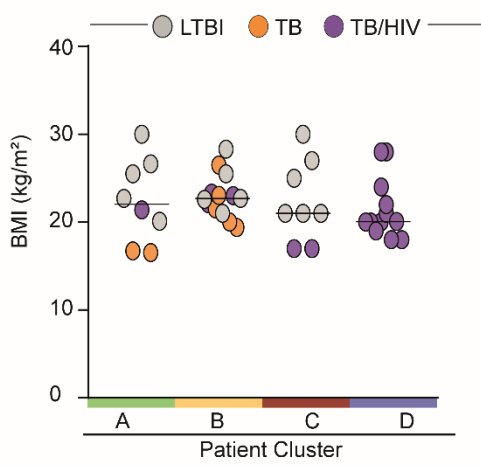
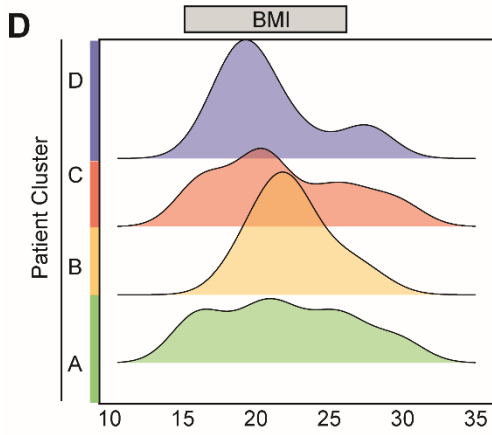
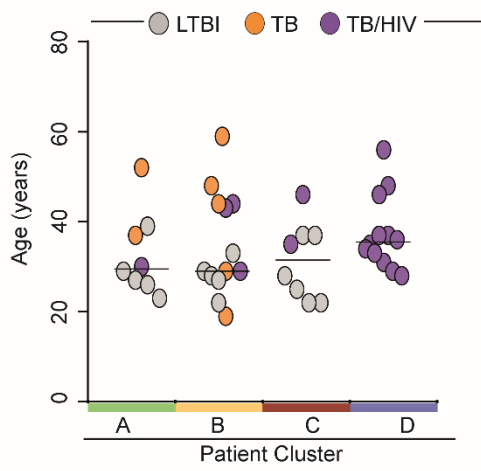
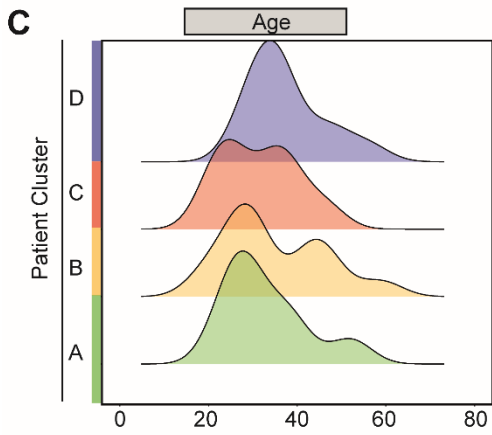
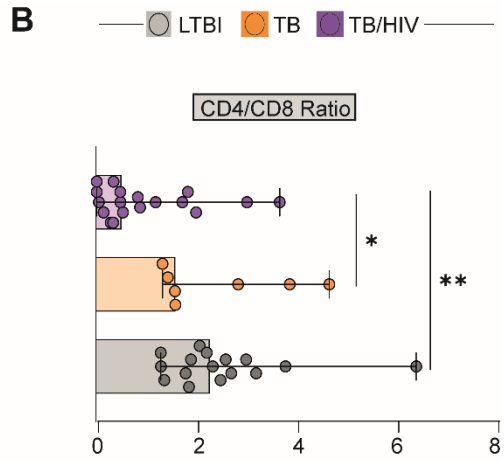
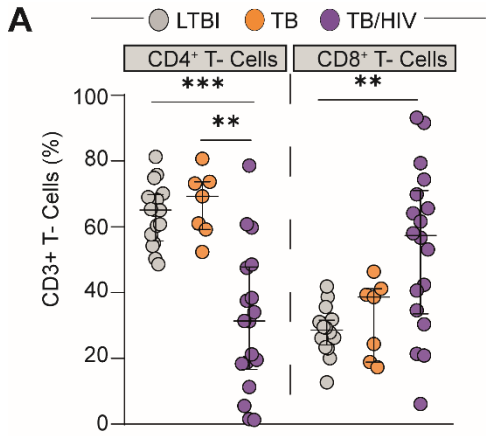
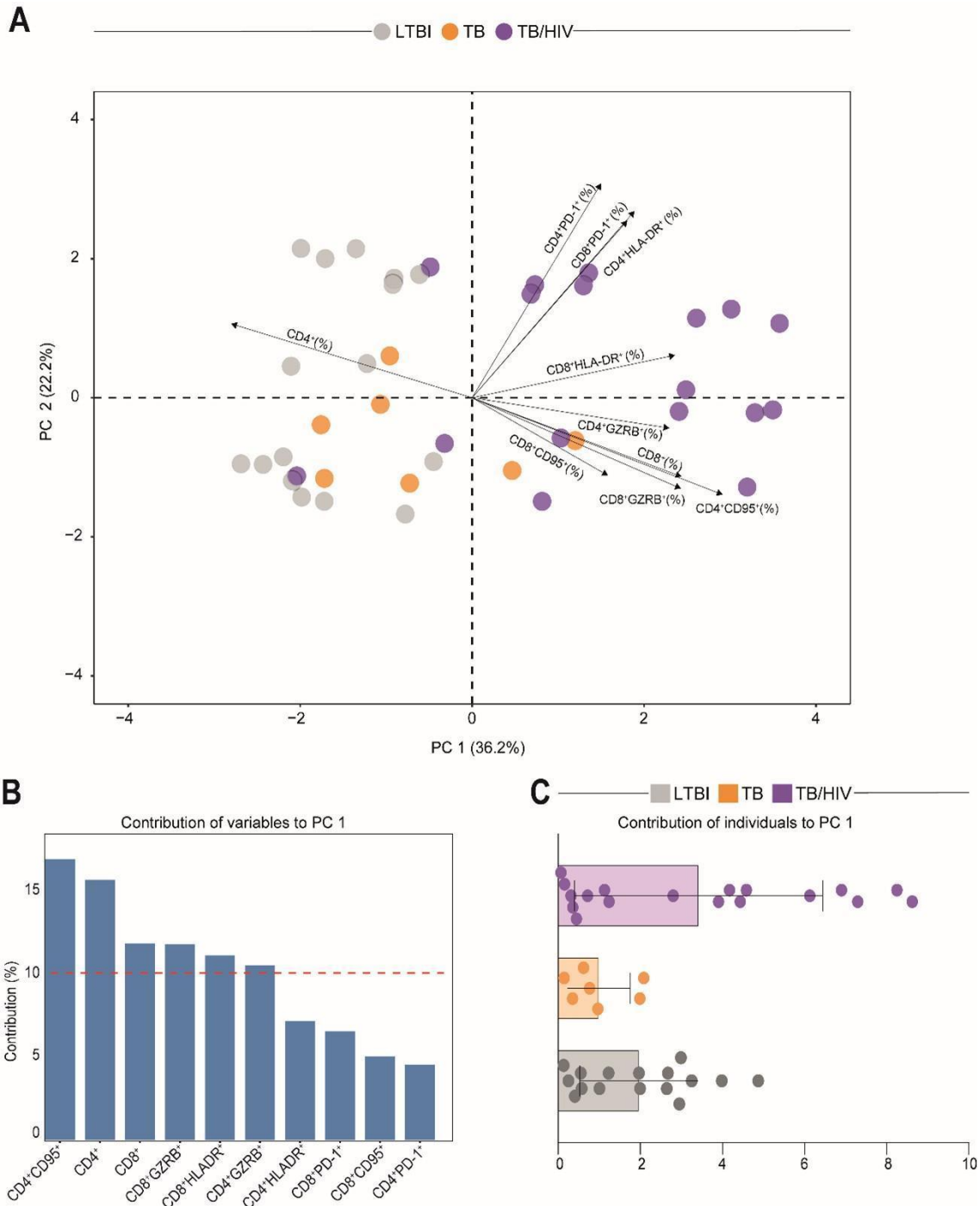


Figure 6- Central memory HLA-DR⁺ CD8 T cells distinguishes patients. A decision Tree model was employed to distinguish among LTBI, TB and TB/HIV patients. Student's t test. P =0.001.



Supplementary Figure 1- Clinical Groups and endotype characteristics. A) Frequencies of CD4 and CD8 T lymphocytes among LTBI, TB and TB/HIV subjects. B) CD4/CD8 ratios. C- E) Kernel probability distributions and scatterplots depict Age, BMI and CD4/CD8 ratios among endotypes. Data were analyzed using the Mann-Whitney test or Wilcoxon matched-pairs test for paired analyses within each study group (*p <, 0.05, **p<, 0.01, ****p<0.0001).



Supplementary Figure 2- Activation profile of T cells. A) Principal component analysis taking into consideration CD4 and CD8 T lymphocytes expressing activation markers. B) Plot depicting the contribution of the TOP 10 cell populations in explaining PC1 variation. C) Plot representing the contribution of each patient to PC1 variation.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que os indivíduos com tuberculose latente, tuberculose ativa e coinfetados TB-HIV apresentam diferenças no perfil de ativação e exaustão de diferentes subcompartimentos linfocitários. Em conformidade com os estudos que sugerem a ocorrência de um amplo espectro de variação da resposta na LTBI (SALGAME et al., 2015), identificamos dois padrões celulares distintos para estes indivíduos, os quais se associaram com diferentes perfis de indivíduos coinfetados TB-HIV, aqui distinguidos em grupos LTBI 1/LTBI 2 e TB-HIV 1/TB-HIV 2. Em LTBI 1 e TB-HIV 1 observamos maior proporção de células com elevada expressão de HLA-DR e PD-1, associada a menores frequências de células positivas para GRZB e CD95. Inversamente, em LTBI 2, TB e TB-HIV 2, proporções diminuídas de HLA-DR e PD-1 estavam associadas a maiores frequências de células positivas para CD95 e GRZB. Esses perfis podem indicar diferentes padrões de ativação constitutiva e atividade citotóxica destas células, o que pode estar associado à cronicidade das infecções e implicar em diferenças nos padrões de exaustão e na progressão da doença. (MACHICOTE et al., 2018; KHAN et al., 2017).

Embora a presença de PD-1 seja mais frequentemente associada a um fenótipo exaurido, são cada vez mais comuns as evidências de que este marcador pode desempenhar um papel efetor/regulador nos linfócitos no contexto da tuberculose (TEZERA et al., 2020). Esse fenótipo é descrito especialmente em T CD8⁺ e associado à presença de HLA-DR nestas células (MACHICOTE et al., 2018).

A presença de PD-1 em células T CD8⁺HLA-DR⁺ foi anteriormente associada a um perfil regulador, onde desempenha papel supressor da capacidade proliferativa de células ativadas, especialmente entre as T CD8⁺ (MACHICOTE et al., 2018). O tratamento anti-PD-1 demonstrou ter um efeito deletério às células hospedeiras em modelos de cultura tridimensional infectadas com Mtb (PINÇA et al., 2020). Na tuberculose, o bloqueio de PD-1 foi correlacionado com a reativação e progressão da TB (TEZERA et al., 2020), e pacientes diagnosticados com câncer em terapia de bloqueio imunológico utilizando fármacos com ação anti-PD-1, demonstram ser suscetíveis à reativação da TB (ELKINGTON et al., 2018).

A associação de PD-1 com o fenótipo de memória, ativação e funções efetoras foi recentemente descrita no contexto da TB (LI et al., 2019, DAY et al., 2018). Nas avaliações realizadas, os autores concluem que linfócitos T positivos para PD-1 não necessariamente estão exauridos, mas possuem função importante na manutenção

de funções efetoras e com polarização para o fenótipo de memória efetora (LI et al., 2019). Ainda corroborando os achados encontrados aqui, a presença de PD-1 em TB é descrita principalmente no compartimento de T CD4⁺, sendo menos representada em CD8⁺ na comparação, não demonstrando diferenças entre os estados clínicos da TB (DAY et al., 2018). A coinfeção TB-HIV também foi correlacionada com uma maior presença de células T CD4⁺PD-1⁺ (POLLOK et al., 2016).

Ainda nestas observações, notamos uma relação inversa entre as proporções de PD-1 e CD95 nos grupos investigados. Um aumento de moléculas pró-apoptóticas, como CD95, em linfócitos tem sido relacionado à tuberculose ativa e à infecção pelo HIV, enquanto em LTBI menor presença destas moléculas é reportada (DAY et al., 2014; HERTOEGHE et al., 2000). CD95 desempenha papel crucial na eliminação de linfócitos T não responsivos, ou exauridos após reestimulação (BOUILLET; O'REILLY, 2009). Sugerimos, a partir dos nossos resultados, que a maior presença deste marcador, somada a maiores proporções de GRZB nos grupos LTBI 2 e TB-HIV 2, pode refletir uma atividade citotóxica persistente nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, caracterizando maior disfunção destas células. Já a maior presença de células HLA-DR⁺PD-1⁺ em TB-HIV 1 e LTBI 1 pode representar a existência de uma resposta imunológica efetora frente ao bacilo (LI et al., 2019), potencialmente associada ao controle dos efeitos deletérios acarretados pelos mecanismos pró-inflamatórios e da resposta citotóxica exagerada aos tecidos pulmonares dos indivíduos infectados (LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2010).

A participação dos subcompartimentos de memória, efetoras e naive também tem sido investigada e revisada por diversos estudos (FERLUGA et al., 2020; KANDER et al., 2019; STEIGLER; VERRALL; KIRMAN, 2019). Aqui encontramos, na comparação geral dos grupos, maiores proporções de células naive em indivíduos LTBI e TB em relação aos coinfectados. Classicamente associadas a um perfil não responsivo, estudos têm revelado uma multifuncionalidade fenotípica de células naive, demonstrando que este compartimento apresenta heterogeneidade de funções, com evidências recentes da existência de subpopulações memória apresentando este fenótipo em T CD4⁺ e T CD8⁺ (CACCAMO et al., 2018; VAN DEN BROEK; BORGHANS e WIJK, 2018). Nesse sentido, estas células podem desempenhar papel direto na resposta frente à micobactéria em LTBI e TB, justificando maior proporção do compartimento nestes grupos. Em contrapartida, o baixo número de células naive nos coinfectados pode refletir um sinergismo entre o bacilo e o vírus contribuindo para

a diferenciação terminal frequente destas células, necessária para a resposta imunológica frente a ambos os patógenos, uma vez que a reconstituição deste compartimento celular foi observada durante o tratamento para TB coinfectados (NALUKWANGO et al., 2017; CHIACCHIO et al., 2014). Corroborando este raciocínio, os indivíduos TB-HIV apresentaram maiores proporções de células de memória central e memória efetora entre os grupos clínicos avaliados.

As células de memória central e memória efetora são relacionadas a uma boa resposta imunológica em doenças infecciosas, sendo as T_{em} mais frequentemente associadas a uma resposta eficiente. Os mecanismos pelos quais células de memória atuam no curso da TB são temas de estudos (TONACO et al., 2017; PERDOMO et al., 2016). Em nossa investigação, encontramos que as células T_{MC} tanto para $CD4^+$ como para $CD8^+$ foram mais representadas nos grupos com doença ativa, com frequência destas células ainda mais aumentada dentro do compartimento de $T CD4^+$. Contudo, apenas TB-HIV diferiu de LTBI em relação a este subcompartimento celular. Novamente observamos maiores frequências de HLA-DR e PD-1 em LTBI 1 e TB-HIV 1, entretanto, desta vez, a positividade para GRZB se mostrou elevada em $T_{cm} CD4^+$ e $CD8^+$ de TB-HIV 1. Esses achados podem indicar uma função citotóxica adicional neste compartimento celular nos indivíduos coinfectados, como indicado anteriormente por Tonaco e colaboradores (2017). O papel das células de memória central foi igualmente associado à melhor resposta em testes de candidatos vacinais contra o Mtb. (VOGELZANG et al., 2014).

Em memória efetora, embora tenha sido observada uma tendência de maior frequência destas células em TB-HIV, não encontramos diferenças nas proporções em relação aos demais grupos. A presença de GRZB e CD95 foi elevada neste compartimento para os grupos TB e TB-HIV. Esse aumento na marcação de CD95 e GRZB, em $T_{em} CD4^+$ e $CD8^+$, observada em TB e TB-HIV, pode indicar que, embora células efetoras estejam presentes nestes indivíduos, elas estejam igualmente exauridas pela constante ativação.

Finalmente, observamos que as células $T CD8^+HLA-DR^+$ podem ser empregadas com boa sensibilidade de distinção de indivíduos com tuberculose ativa, em coinfeção ou não com HIV, dos indivíduos com a doença latente, com base na maior frequência de detecção destas células. O estabelecimento de biomarcadores capazes de distinguir estas fases da doença pode ter um impacto importante na

detecção precoce de casos (LUO et al., 2021; SILVEIRA-MATTOS et al., 2020) e merece maior investigação.

CONCLUSÃO

Linfócitos de pacientes com LTBI, TB e coinfectados TB-HIV possuem diferentes perfis de ativação, que distinguem também subgrupos entre os indivíduos com LTBI e com TB-HIV, com potenciais implicações clínicas. Esses subgrupos LTBI e TB-HIV diferem quanto às proporções de células positivas para HLA-DR, PD-1, GRZB e CD95. Reconhecemos, portanto, um perfil efetor/regulador que pode ser associado a uma resposta imune efetora controlada, e um perfil relacionado com atividade citotóxica, especialmente mediada por células TCD8⁺, potencialmente exagerada e deletéria. Encontramos ainda um potencial discriminatório de Tcm CD8⁺HLA-DR⁺ para os indivíduos coinfectados TB-HIV em relação aos demais grupos clínicos. Nossos resultados representam novas evidências sobre o perfil de linfócitos T em diferentes apresentações clínicas da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; RAKSHIT, S.; VYAKARNAM, S. HIV–TB co-infection: mechanisms that drive reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV infection. **Oral Diseases**, v. 22, p. 53-60, 2016.
- BELL, L. C. K. e NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection, **Natural Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80-90, 2018.
- BOUILLET, P.; O'REILLY, L. A. CD95, BIM and T cell homeostasis. **NATURE REVIEWS Immunology**, v. 9, p. 519, 2009.
- CACCAMO, N. et al. Atypical Human Effector/Memory CD4⁺ T Cells With a Naive-Like Phenotype. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2832, 2018.
- CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M. e FLYNN, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. **Natural Reviews in Immunology**, v. 17, n. 11, p. 691–702, 2017.

CHIACCHIO, T. et al. Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. **Journal of Infection**, v. 69, n. 6, p. 533-545, 2014.

DAY, C. L. et al. Patients with Tuberculosis Disease Have Mycobacterium tuberculosis-Specific CD8 T Cells with a Pro-Apoptotic Phenotype and Impaired Proliferative Capacity, Which Is Not Restored following Treatment. **PLoS**

ONE, v. 9, n. 4, e94949, 2014.

DAY, C. L. et al. PD-1 Expression on Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4 T Cells Is Associated With Bacterial Load in Human Tuberculosis. **Frontiers**

in Immunology, v. 9, n. 1995, 2018.

DRIERICH, C.R. et al. Relationship between HIV-1 co-infection, IL-10, and M. tuberculosis in human lymph node granulomas. **Journal of Infectious Diseases Advance**, 2016.

ELKINGTON, P. T. et al. Implications of tuberculosis reactivation after immune checkpoint inhibition. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 198, n. 11, p. 1451-1453, 2018.

FERLUGA, J. et al. Natural and trained innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. **Immunobiology**, v. 225, n. 3, p. 151951, 2020.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. F. et al. Extrapulmonary tuberculosis: epidemiology and risk factors. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 7, p. 502–509, 2011.

HERTOGHE, T. et al. T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB). **Clinical**

and Experimental Immunology, v. 1, n. 1, 2000.

HOPE, J. L. et al. Striking a balance—cellular and molecular drivers of memory T cell development and responses to chronic stimulation. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1595, 2019.

KANDER, S. A. et al. Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. **The Journal of Clinical investigation**, v. 129, n. 9, p. 3482-3491, 2019.

KHADER, S. A. et al. Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 9, p. 3482-3491, 2020.

KHAN, N. et al. T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 2, p. 133-141, 2017.

LÁZÁR-MOLNÁR, E. et al. Programmed death-1 (PD-1)–deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 30, p. 13402-13407, 2010.

LI, H. et al.

Mycobacterium tuberculosis PE13 (Rv1195) manipulates the host cell fate via p38-ERK-NF- κ B axis and apoptosis. **Apoptosis**, v. 21, n. 7, p. 795-808, 2016.

LIN, J. N. et al.

Risk factors for extra-pulmonary tuberculosis compared to pulmonary tuberculosis. **International**

Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 13, n. 5, p. 620-625, 2009.

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

LODDENKEMPER, R.; LIPMAN, M. e ZUMLA, A. Clinical Aspects of Adult Tuberculosis. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 6, n. 1, a017848, 2015.

LUO, Y. et al. Activation Phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*-Specific CD4⁺ T Cells Promoting the Discrimination Between Active Tuberculosis and Latent Tuberculosis Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12. 2021.

MACHICOTE, A. et al. Human CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells, Similarly to Classical CD4⁺Foxp3⁺ Cells, Suppress Immune Responses via PD-1/PD-L1 Axis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2788, 2018.

MONGA, S. et al. Clinical study of extrapulmonary head and neck tuberculosis in an urban setting. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 37, p. 493-499, 2017.

NALUKWAGO, S. et al. The effect of interrupted anti-retroviral treatment on the reconstitution of memory and naive T cells during tuberculosis treatment in HIV patients with active pulmonary tuberculosis. **African health sciences**, v. 17, n. 4, p. 954-962, 2017.

NDHLOVU, Z. M. et al. Magnitude and kinetics of cd8⁺ t cell activation during hyperacute hiv infection impact viral set point. **Immunity**, v. 43, p. 1-14, 2015.

O'GARRA, A. et al. The Immune Response in Tuberculosis. **Annual Reviews in Immunology**, v. 31, p. 475–527, 2013.

PERDOMO, C. et al. Mucosal BCG Vaccination Induces Protective Lung-Resident Memory T Cell Populations against Tuberculosis. **MBio**, v. 7, n. 6, e01686-16, 2016.

ROWIŃSKA-ZAKRZEWSKA, E. et al. What factors may influence epidemiological situation of tuberculosis in Poland and in the world? **Pneumonologia i Alergologia Polska**, v. 84, n. 2, p.126–133, 2016.

SALGAME, P. et al. Latent tuberculosis infection—revisiting and revising concepts. **Tuberculosis**, v. 95, n. 4, p. 373-384, 2015.

SANCHES, L.; CARVALHO, A.; DUARTE, R. Who are the patients with extrapulmonary tuberculosis? **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 21, n. 2, p. 90-93, 2015.

SHAO, L. et al. Hierarchy low CD4⁺/CD8⁺ T-cell counts and IFN- γ responses in HIV-1⁺ individuals sorrelate with active TB and/or Mtb Co-Infection. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1-12, 2016.

SILVEIRA-MATOS, P. S. et al. Differential Expression of Activation Markers by Mycobacterium tuberculosis-specific CD4⁺ T Cell Distinguishes Extrapulmonary From Pulmonary Tuberculosis and Latent Infection. **Clinical infectious disease**, v. 71, n. 8, p. 1905-1911, 2020.

STEIGLER, P; VERRALL, A. J.; KIRMAN, J. R. Beyond memory T cells: mechanisms of protective immunity to tuberculosis infection. **Immunology and cell biology**, v. 97, n. 7, p. 647-655, 2019.

SZKWARKO, D. et al. Tuberculosis: an epidemic perpetuated by health inequalities. **Rhode Island medical journal (2013)**, v. 102, n. 7, p. 47, 2019.

TEZERA, L. B. et al. Anti-PD-1 immunotherapy leads to tuberculosis reactivation via dysregulation of TNF- α . **Elife**, v. 9, p. e52668, 2020.

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

VAN DEN BROEK, T.; BORGHANS, J. A. e WIJK, F. V. The full spectrum of human naive T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 363-373, 2018.

VOGELZANG, A. et al. Central Memory CD4⁺ T Cells Are Responsible for the Recombinant Bacillus Calmette-Guérin Δ ureC::hly Vaccine's Superior Protection Against Tuberculosis. **The Journal of Infectious Disease**, 2014.

8.3 CAPÍTULO 03: MANUSCRITO

Análise do perfil transcricional de genes associados ao desenvolvimento, diferenciação e função de linfócitos T em indivíduos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, na presença ou não de coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana.

SANTANA CC¹, DANTAS PS¹, MOTA SM¹, OLIVEIRA, GS¹, ROCHA MS¹, OLIVEIRA YSA¹, CHAVES ARB¹, PINA ICA¹, SILVA MO¹, MARINHO JM¹, CONCEIÇÃO EL¹, WEYENBERGH JV², BARBOSA T.¹

¹Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz Bahia.²Katholieke Universiteit Leuven (Bélgica).

Autor correspondente: theolis.bessa@fiocruz.com.br

RESUMO

A dificuldade no diagnóstico da tuberculose contribui para sua classificação como uma das doenças infecciosas que mais afetam a população. A ineficiência na detecção precoce dos indivíduos com doença latente dificulta ainda mais o rastreamento dos grupos de risco para a doença. Padrões de expressão de genes envolvidos na fisiopatologia da doença têm sido cada vez mais investigados, e a determinação dessas variações em genes relacionados aos diferentes processos imunológicos frente à doença desponta como uma alternativa possível para a distinção de indivíduos infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em maior risco de desenvolver a doença ativa. Buscamos identificar os diferentes perfis transcricionais de genes associados ao desenvolvimento, ativação e função da resposta imune em LTBI, TB, HIV e TB-HIV. Observamos os transcritos relacionados às células de memória central foram mais presentes indivíduos coinfectados, e os genes AK5, FAS/CD95 e IL17A apresentaram capacidade de discriminar os grupos clínicos avaliados. Esses resultados podem direcionar novas abordagens para o estabelecimento de biomarcadores das diferentes apresentações da infecção pelo Mtb.

Palavras-chave: Tuberculose, TB-HIV, expressão gênica, AK5, IL17A.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) permanece como um problema de saúde pública em diferentes países ao redor do mundo. Mesmo após o centenário de desenvolvimento da vacina contra a doença, seu controle ainda não foi alcançado e milhares de casos e óbitos ocorrem todos os anos (OMS, 2021). Diferentes fatores contribuem para o sucesso da infecção e a dificuldade no manejo da doença. A crescente resistência aos antimicrobianos utilizados, a grande proporção de pacientes que interrompem precocemente o tratamento, a dificuldade de detecção de indivíduos com a forma latente da doença (LTBI), e que podem vir futuramente a desenvolver a forma ativa, e a presença de certas comorbidades, como a infecção pelo HIV, tornam as metas de eliminação da TB ainda mais urgentes (OMS, 2021; MONGA et al., 2017).

Um dos desafios para controle da tuberculose é a incapacidade dos testes de diagnóstico atualmente disponíveis em detectar casos latentes de forma precoce (DOMÍNGUEZ; LATORRE; SANTIN, 2017; ZHANG et al., 2016). Essa limitação está relacionada, em parte, a lacunas ainda existentes na compreensão dos mecanismos de resposta imunológica que contribuem para os diferentes graus de proteção apresentados por indivíduos infectados com e sem doença (SIA; RENGARAJAN, 2019).

O sucesso da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é dependente da virulência do bacilo, bem como de características genéticas do hospedeiro (CORREA-MACEDO, CAMBRI e SCHURR, 2019; ABEL, et al., 2018), e variantes genéticas presentes nos hospedeiros parecem contribuir para uma proteção ou suscetibilidade à infecção ativa (MANDAL et al., 2019). A micobactéria é capaz de gerar alterações genéticas nas células infectadas como mecanismo de evasão e sobrevivência (UPADHYAY; MITTAL; PHILIPS, 2018). Relacionado a isso, reconhece-se padrões diferenciais de expressão de genes envolvidos em processos relacionados à contenção do bacilo. Entre esses processos ressalta-se os relacionados às vias de morte celular e eventos de diferenciação, desenvolvimento e ativação de células imunológicas como influentes no curso das diferentes formas da TB, incluindo a coinfeção tuberculose-vírus da imunodeficiência humana (ALAM et al., 2021).

A busca de novas tecnologias de diagnóstico para as doenças tem sido estimulada por importantes organizações supranacionais que fomentam a saúde em nível global, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Fundação para Novos Diagnósticos Inovadores (do inglês Foundation for New and Innovative Diagnostics -

FIND) (OMS, 2017). Na tuberculose, diversas estratégias têm sido realizadas para buscar alternativas de detecção e predição da progressão da doença, a partir de dados de metabolômica, transcriptômica, e perfil celular, entre outros (DUTTA, et al., 2020; SILVEIRA-MATOS, et al., 2020; LAU et al., 2015). De forma mais recente, trabalhos têm focado a expressão de genes na busca de possíveis biomarcadores que possibilitem a diferenciação dos estágios clínicos da TB (QIU et al., 2020; SUDBURY et al., 2020; WU et al., 2017; TORNHEIM et al., 2020), bem como a predição do risco de ativação da tuberculose em indivíduos coinfectados TB-HIV (KAFOROU et al., 2013). O depósito dessas informações em bancos de dados genéticos serve de fonte de informações para diferentes grupos de pesquisa pelo mundo, permitindo investigações complementares.

Em uma revisão sistemática de literatura realizada pelo nosso grupo, encontramos uma série de genes relacionados às vias de morte celular que foram relatados como diferencialmente expressos no contexto da tuberculose (SANTANA et al. - dados não publicados). Alguns deles, como IFN γ e TNF, aparecem de forma frequente nas investigações de transcriptômica no contexto da tuberculose (SIVAKUMARAN, et al., 2020; WANG et al., 2019) e são associados à ocorrência da doença. Também identificamos alterações nas proporções de compartimentos celulares T CD4⁺ e T CD8⁺ associados a perfis de linfócitos naive, efetores e de memória central e periférica, bem como diferenças no perfil de expressão de moléculas envolvidas na ativação nesses compartimentos celulares, quando comparamos voluntários LTBI, TB e TB-HIV (SANTANA et al. - dados não publicados). Estes trabalhos corroboram a possibilidade de identificação de biomarcadores de diferentes estados clínicos entre as moléculas envolvidas na resposta de linfócitos, as quais podem participar da resposta imunológica diferencial observada nesses grupos.

No presente trabalho nós buscamos avaliar a possível ocorrência de uma assinatura genética em indivíduos com LTBI, TB, HIV e TB-HIV que possa ser associada às características clínicas e biológicas de cada grupo. Para isso, realizamos uma análise da expressão de mRNA de genes para moléculas relacionadas a processos celulares relevantes no contexto da infecção pelo Mtb, com destaque para moléculas envolvidas em diferentes perfis de linfócitos T.

METODOLOGIA

População de estudo

Os pacientes incluídos neste estudo foram classificados quanto aos seguintes grupos clínicos: Tuberculose Latente (LTBI), Tuberculose Pulmonar (TB), infectados com HIV (HIV⁺) e coinfectados com TB e HIV (TB-HIV).

Foram recrutados pacientes recém-diagnosticados com tuberculose, que ainda não haviam iniciado o tratamento, atendidos no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM-SESAB). Esses pacientes realizaram teste para avaliação da presença de coinfeção com o HIV. Os pacientes diagnosticados com HIV, que foram igualmente submetidos a investigação de coinfeção com tuberculose, foram recrutados entre aqueles atendidos no Centro Estadual Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa (CEDAP-SESAB) ou no Serviço Municipal de Assistência Especializada – SEMAE. Ainda, voluntários sadios infectados com TB em infecção latente (LTBI), diagnosticada por prova tuberculínica (intradermorreação com endureção igual ou superior a 10 mm após 48-72h) ou reconhecimento específico de antígenos de *M. tuberculosis* detectado por ensaio de liberação de interferon-gamma - (IGRA - Quantiferon TB-GOLD test, Qiagen, CA), também fizeram parte da amostra deste estudo. Todas as instituições onde os recrutamentos foram realizados estão localizadas na cidade de Salvador, estado da Bahia, Brasil.

Os pacientes apresentavam idade entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos e sem histórico de abandono do tratamento anterior para a tuberculose.

Aspectos éticos

Os princípios éticos expressos na Declaração de Helsinki nortearam as avaliações clínicas deste trabalho.

A realização do estudo foi aprovada pelo Conselho de Ética em Pesquisas do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz sob o registro CAAE 21823713.8.0000.0040, Protocolo CEP-CPqGM/Fiocruz n° 350/2011.

Um termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelos voluntários, após terem sido informados sobre todos os procedimentos a serem realizados e concordarem livremente em participar do estudo. Os termos assinados permanecem sob a guarda da instituição onde as análises foram realizadas.

Análise de expressão gênica por RNAseq

Para quantificar níveis de expressão de moléculas relacionadas à morte celular e às respostas imunes inata e adaptativa, especialmente à função de CTLs, foi utilizado RNA total extraído de amostras de sangue total de voluntários com LTBI, TB, HIV e TB-HIV.

Amostras de sangue total mantidas em nitrogênio líquido foram descongeladas e processadas com o kit RNeasy (Qiagen), seguindo um protocolo adaptado a partir das orientações do fabricante. Sobre as amostras de sangue total ainda congeladas foram adicionados 300 µL do tampão de lise RLT (RNeasy, Qiagen). Após descongelamento, 600 µL do sobrenadante foram coletados e submetidos à agitação por 10 minutos em vortex. Adicionou-se fenol-clorofórmio ao preparado (600 µL por tubo), seguido por agitação por mais 10 minutos em vortex. Os tubos foram acondicionados a 4°C por 10 min. Esses procedimentos foram repetidos mais uma vez até que se obtiveram sobrenadantes transparentes. Sobre estes sobrenadantes foi adicionado igual volume de etanol 70% e o material foi então processado conforme o protocolo do RNeasy (Qiagen) fornecido pelo fabricante.

O RNA obtido foi quantificado utilizando o NanoDrop instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) e sua integridade avaliada com a utilização do Bioanalyzer RNA 6000 pico. O RNA ribossomal foi depletado através do kit Ribogold zero. As amostras apresentaram valor RIN (índice de integridade de RNA) menor que 6,0, entretanto comparável entre as amostras.

As bibliotecas de RNA-seq foram preparadas usando o Nugen Ovation Trio low input RNA Library Systems V2 (Nugen; 0507–08) conforme instruções do fabricante pela Plataforma de Nucleômica (VIB, Leuven, Belgium). As bibliotecas agrupadas foram sequenciadas como 150 bp e as leituras finais emparelhadas em um Illumina HiSeq 2500 usando v4 chemistry.

A remoção de adaptadores e a limpeza dos reads com Phred quality menor que 20 foi realizada com Trimmomatic (0.36). A limpeza as leituras alinhadas ao genoma de referência do *Homo sapiens* (hg38) foi realizada pelo STAR (2.6.0 c). Leituras alinhadas foram mapeadas para os genes de interesse usando o feature Counts do Subread package (1.6.1). Genes com leituras menores que 3 foram removidos. As bibliotecas foram usadas para transformar as contagens brutas em TPM (transcritos por milhão) usando o edgeR (3.10.0). Os dados foram transformados usando o limma voom function (3.36.2) e todas as análises realizadas em único batch.

Análises estatísticas

Os dados foram representados como proporções, quando categóricos e como medianas e intervalos interquartis (IQR), nos casos de variáveis contínuas. As análises de significância foram realizadas usando o teste Kruskal-Wallis e one-Way-ANOVA. Os valores de p foram considerados estatisticamente significantes quando < 0.05 .

Para avaliar as similaridades e diferenças no perfil de expressão gênica, realizamos uma análise não supervisionada de agrupamento hierárquico usando o método de Ward, onde dendrogramas representam a distância euclidiana, e análises de componentes principais. A estimativa de distribuição do gene AK5 foi realizada por Análise de Densidade de Kernel e a projeção linear dos dados de expressão de genes possivelmente associados às condições clínicas estudadas foi realizada pela Projeção de FreeViz. Essas análises, além da confecção dos gráficos violin plot, foram realizadas no programa Orange Data mining (Copyright © University of Ljubljana).

A Análise de Curva Característica de Operação do Receptor (ROC) foi realizada para avaliar o potencial de genes selecionados em distinguir os grupos clínicos avaliados, e o cálculo da Área Sob a Curva (AUC) utilizado para avaliação da precisão geral de cada marcador. As análises de curva ROC e a confecção dos gráficos de barras, foram realizadas no Graphpad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc).

RESULTADOS

A análise do perfil transcriptômico de voluntários dos grupos estudados evidenciou a divisão dos indivíduos em 4 diferentes clusters hierárquicos com base na presença de transcritos relacionados aos subcompartimentos de memória e naive nos linfócitos T (Figura 1).

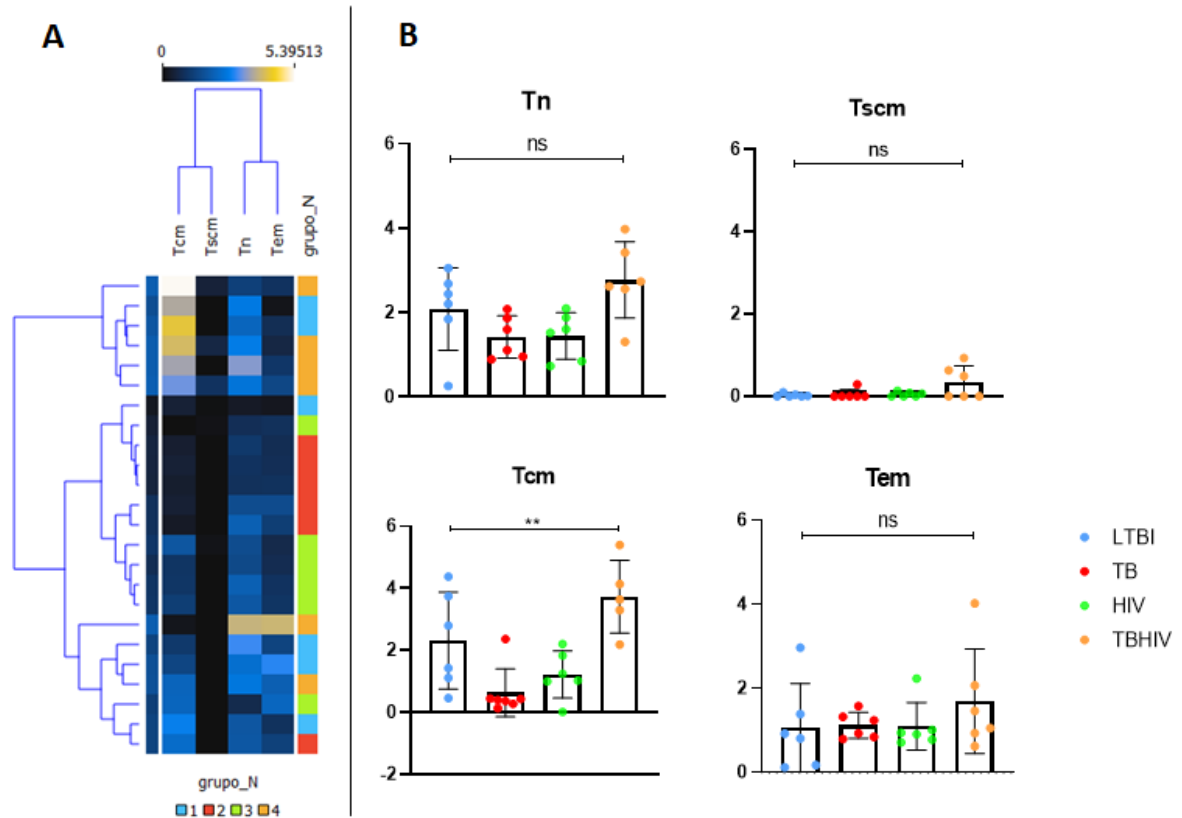


Figura 1. Transcritos para compartimentos de linfócitos T em pacientes com LTBI, TB, HIV e TB-HIV. A - Cluster hierárquico para avaliar similaridades entre os grupos em relação à quantificação de mRNA relacionados aos compartimentos celulares de linfócitos T. **B -** gráfico de barras com o quantitativo de transcritos nos grupos clínicos avaliados. Dados foram analisados usando o teste Kruskal-Wallis para análises pareadas entre os grupos estudados (** $p < 0.01$).

O primeiro cluster, composto por indivíduos dos grupos LTBI e TB-HIV, apresenta maior proporção de transcritos relacionados às células de memória central e naive, contudo, menores proporções de transcritos relacionados às células de memória efetora. Nesse cluster também estão os indivíduos que apresentaram maior expressão de genes caracteristicamente presentes em células denominadas células tronco de memória (Tscm - T stem cells), embora esta presença não tenha sido substancial (Figura 1 A).

O segundo grupo hierárquico é marcado pelas menores proporções de células T de memória central e naive, em comparação com todos os outros clusters. Nesse agrupamento, predominam os indivíduos mono infectados com TB.

No terceiro cluster, onde estão agrupados a maioria dos indivíduos infectados com HIV, observamos uma maior frequência de transcritos para células T naive em

comparação ao quantitativo de mRNA para os demais compartimentos celulares. Entretanto, observamos menor proporção quando comparamos com os valores encontrados para este compartimento nos clusters 1 e 4. Nota-se um aumento de transcritos relativos às células T de memória central nos indivíduos mono infectados com HIV que compõem este grupo, entretanto o mesmo não é observado para os dois indivíduos mono infectados com TB agrupados aqui. A presença de transcritos relativos à expressão de células de memória efetora neste grupo é semelhante ao observado para o agrupamento 2.

O último cluster, composto por indivíduos dos 4 grupos alvo destas análises, porém com maior contribuição dos indivíduos com LTBI, apresenta proporções aumentadas de mRNA para células naive, de memória efetora e memória central (embora para este compartimento seja observada menor expressão em comparação com o cluster 1). No cluster 4 está presente o único indivíduo co infectado com TB-HIV que apresenta proporções elevadas de transcritos para células T naive e de memória efetora, na comparação com os demais voluntários que fazem parte deste trabalho.

Comparando os grupos clínicos LTBI, TB, HIV e TB-HIV quanto à frequência de mRNA detectado para os diferentes perfis de células T foi encontrada diferença significativa entre os indivíduos com infecção latente e os co infectados no compartimento de memória central, não sendo observadas diferenças nos demais compartimentos analisados (Figura 1 B).

A seguir, buscamos investigar a presença de transcritos de genes envolvidos nos processos relacionados ao desenvolvimento, diferenciação e função de linfócitos T nos grupos estudados (Figura 2).

Nesta análise observamos três principais clusters. O primeiro cluster, formado somente por indivíduos TB e co infectados TB-HIV (Figura 2 A), agrupa os maiores valores de expressão para a maioria dos genes investigados. Entre eles estão TCF7, NCAM1, ITGAL, STAT4, STAT3 SELL, CD86, LEF1, KLDRG1 e HNRNPLL, associados aos processos de desenvolvimento e diferenciação de linfócitos, além dos associados à ativação destas células como GZMA, GZMB e INFG, somados à forte presença de transcritos para GNLY e KLRG1. A presença de transcritos relacionados à exaustão/morte celular como FAS/CD95, FASLG e PDCD1 também está aumentada neste cluster, embora PDCD1 seja detectado em menor proporção em relação a FAS. Nestes indivíduos também houve maior presença de transcritos para CCR7, molécula associada ao fenótipo de células naive e memória central, especialmente nos

indivíduos TB, em discordância com as baixas frequências destes compartimentos celulares apresentados na análise anterior.

O segundo cluster apresenta em geral as menores proporções para os genes avaliados. Entre os genes com expressão aumentada neste cluster, formado majoritariamente por indivíduos mono infectados com HIV, mas onde também estão inseridos três indivíduos LTBI, destacamos KLRB1, TCF7 e ITGAL. Transcritos para outros genes como CD160, STAT4, IFNG, TGFB1, SELL, FAS, GNLY apresentam-se levemente aumentados, contudo, em menores proporções quando comparados com os demais clusters. Na comparação com os demais grupos, indivíduos mono infectados com HIV apresentaram as menores proporções de transcritos para FAS.

O último agrupamento é o único que contém representantes de todos os grupos clínicos estudados. Nele observamos proporções aumentadas para grande parte dos genes estudados, embora atinjam níveis menos elevados do que aqueles característicos do cluster 1. Nota-se que os indivíduos TB e TB-HIV agrupados neste cluster possuem as maiores quantificações para os transcritos de CD244, ITGAL, IL10, NCAM1, HAVCR2 (TIM3), TCF7 e GNLY quando comparados aos demais indivíduos deste agrupamento hierárquico. Os indivíduos LTBI deste grupo apresentam padrão de expressão semelhante ao apresentado pelos indivíduos com TB e TB-HIV do mesmo cluster. Embora a expressão gênica seja em geral inferior, considerando a maioria dos genes, excetuam-se TCF7, ITGAL, STAT3 e IFNG, com maior quantificação destes transcritos dentre os indivíduos LTBI.

As análises de agrupamento demonstraram um perfil transcricional dos subconjuntos de linfócitos T que foi compartilhado entre indivíduos dos grupos TB e TB-HIV. A agregação entre os indivíduos LTBI e HIV, bem como entre TB e TB-HIV, foi confirmada pela análise de componentes principais (Figura 2 B).

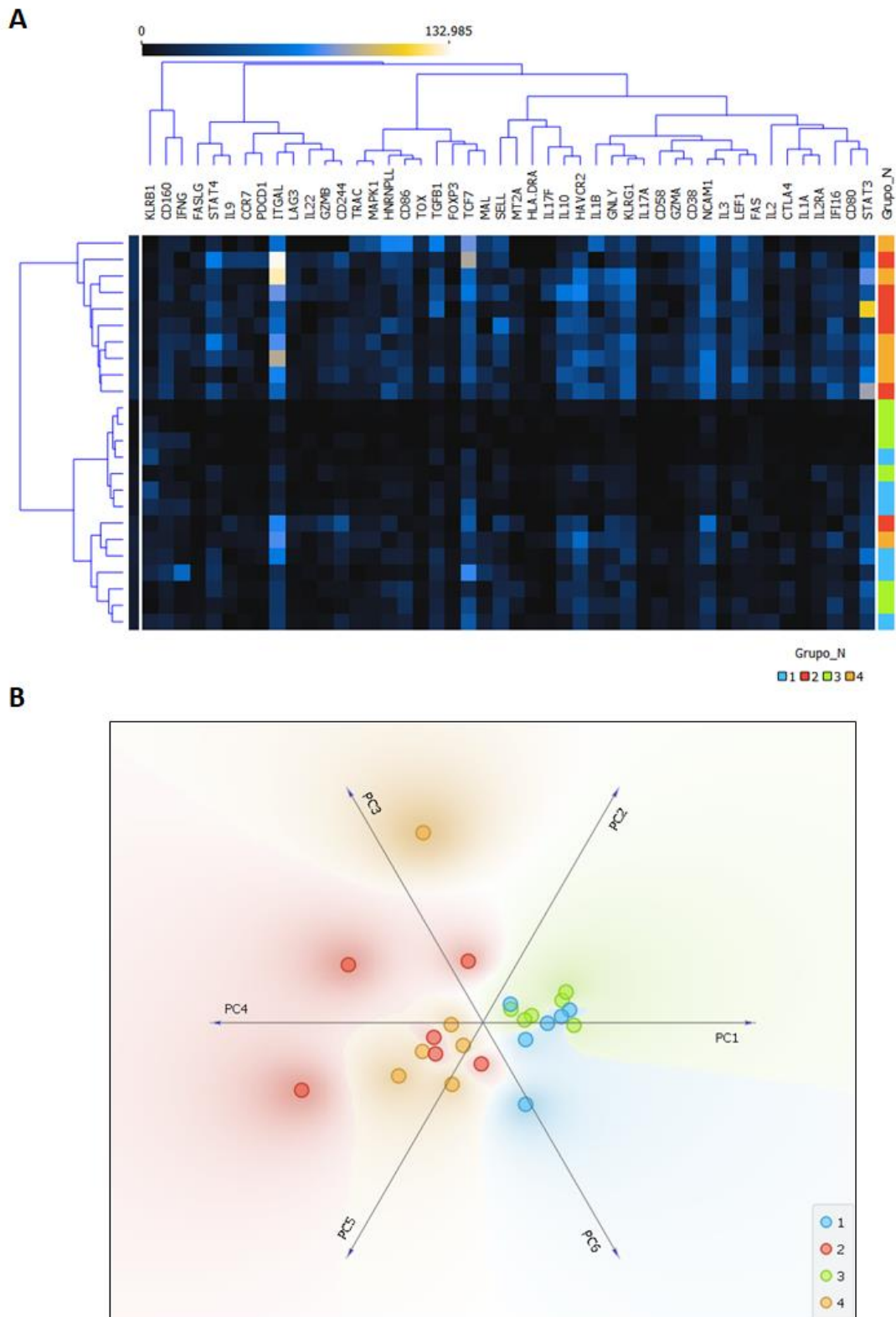


Figura 2. Perfil transcricional relativo ao desenvolvimento, diferenciação e atividade de linfócitos em voluntários LTBI, TB, HIV e TB-HIV. A - Cluster hierárquico para avaliar similaridades entre os grupos em relação à quantificação de mRNA relacionados ao desenvolvimento, diferenciação e função linfócitos T. B - Análise de componentes principais demonstrando o agrupamento dos grupos clínicos TB com TB-HIV e de LTBI com HIV.

Nosso próximo passo consistiu em avaliar o perfil de expressão de genes associados à progressão da tuberculose nos grupos estudados, uma vez que as análises observadas até aqui indicaram uma maior proximidade entre os perfis transcricionais dos indivíduos coinfectados TB-HIV e monoinfectados com TB, porém não com indivíduos monoinfectados com HIV.

As análises novamente indicam uma proximidade entre os coinfectados e TB, marcada pela expressão aumentada de moléculas como AK5, FTH1, STAT1, STAT3, TGFB1, TGFBR1, FCGR1A e FCGR1B (Figura 3 A). Os níveis de expressão de mRNA para TGFB1 mostraram-se mais elevados nos TB-HIV em comparação aos demais grupos, embora não tenha sido encontrada diferença significativa nos valores deste grupo em relação à TB (Figura 3 B). Para este mesmo gene, TB-HIV e TB apresentaram diferenças significativas nos níveis de mRNA na comparação com LTBI e HIV. Já quanto à presença de transcritos para o receptor TGFBR1, LTBI e TB não diferiram estatisticamente. De forma marcante, evidencia-se altos valores de transcritos para AK5, gene recentemente associado à TB, onde, nos grupos com TB ativa, seja em mono ou infecção, os valores mostraram-se significativamente diferentes daqueles encontrados para os indivíduos com infecção latente pelo M.tb.. e para os monoinfectados com HIV (Figura 3 C). Outras diferenças foram observadas entre TB e HIV para STAT3 e FCGR1A. Este último gene também mostrou-se diferentemente expresso entre TB-HIV e HIV. Em indivíduos HIV foi também observada diferença na quantidade de mRNA para FCGR1B (Figura 3 B).

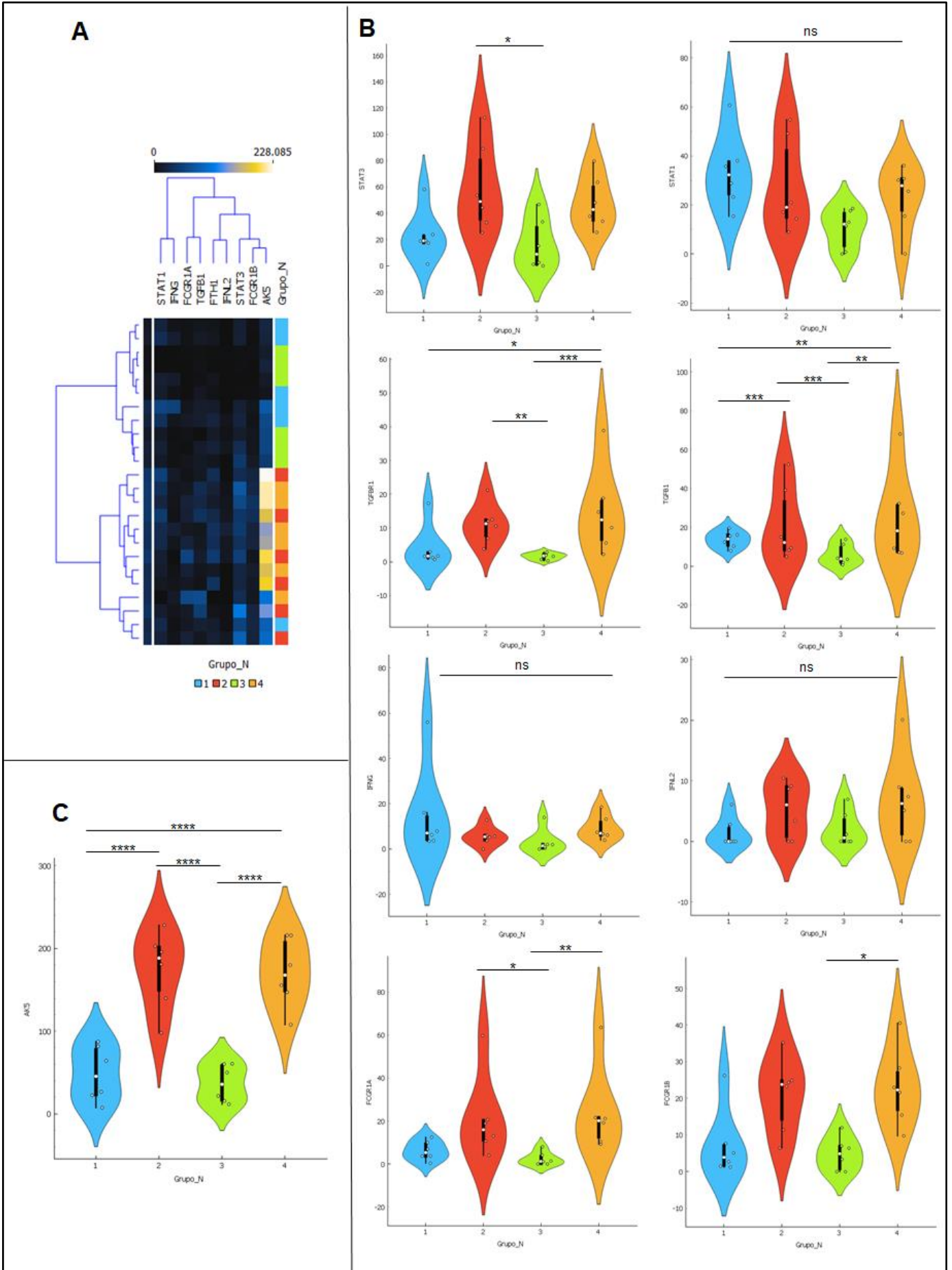


Figura 3. Avaliação da presença de transcritos de genes previamente associados à progressão da tuberculose nos grupos clínicos LTBI, TB, HIV e TB-HIV. A - Cluster hierárquico com similaridades entre os grupos em relação à quantificação de mRNA de genes associados à progressão da TB. **B** - Frequências de mRNA para os grupos clínicos estudados. **C** - Frequência de transcritos de AK5 para os grupos alvo. D dos foram analisados usando o teste Kruskal-Wallis e Ordinary one-way ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Com base nos valores de diferença de expressão encontrados para o gene AK5, especialmente alto para os grupos com infecção ativa para a TB, buscamos avaliar se AK5 poderia configurar um biomarcador que viabilizasse a distinção entre os indivíduos dos grupos analisados. Através de análise de distribuição verificamos que AK5 é capaz de distinguir os indivíduos com doença ativa, infectados com TB, dos demais grupos analisados, independente de mono ou coinfeção (Figura 4 A). Nota-se uma sobreposição dos grupos TB e TB-HIV, com alta frequência de transcritos para este gene. Os resultados foram confirmados por análise de curva ROC, onde AK5 apresentou alta sensibilidade de detecção dos indivíduos TB, tanto em mono quanto em coinfeção com HIV, quando comparados ao grupo com infecção latente (comparações realizadas apenas com LTBI refletiram resultados semelhantes aos encontrados usando HIV como grupo comparador) (Figura 4 B).

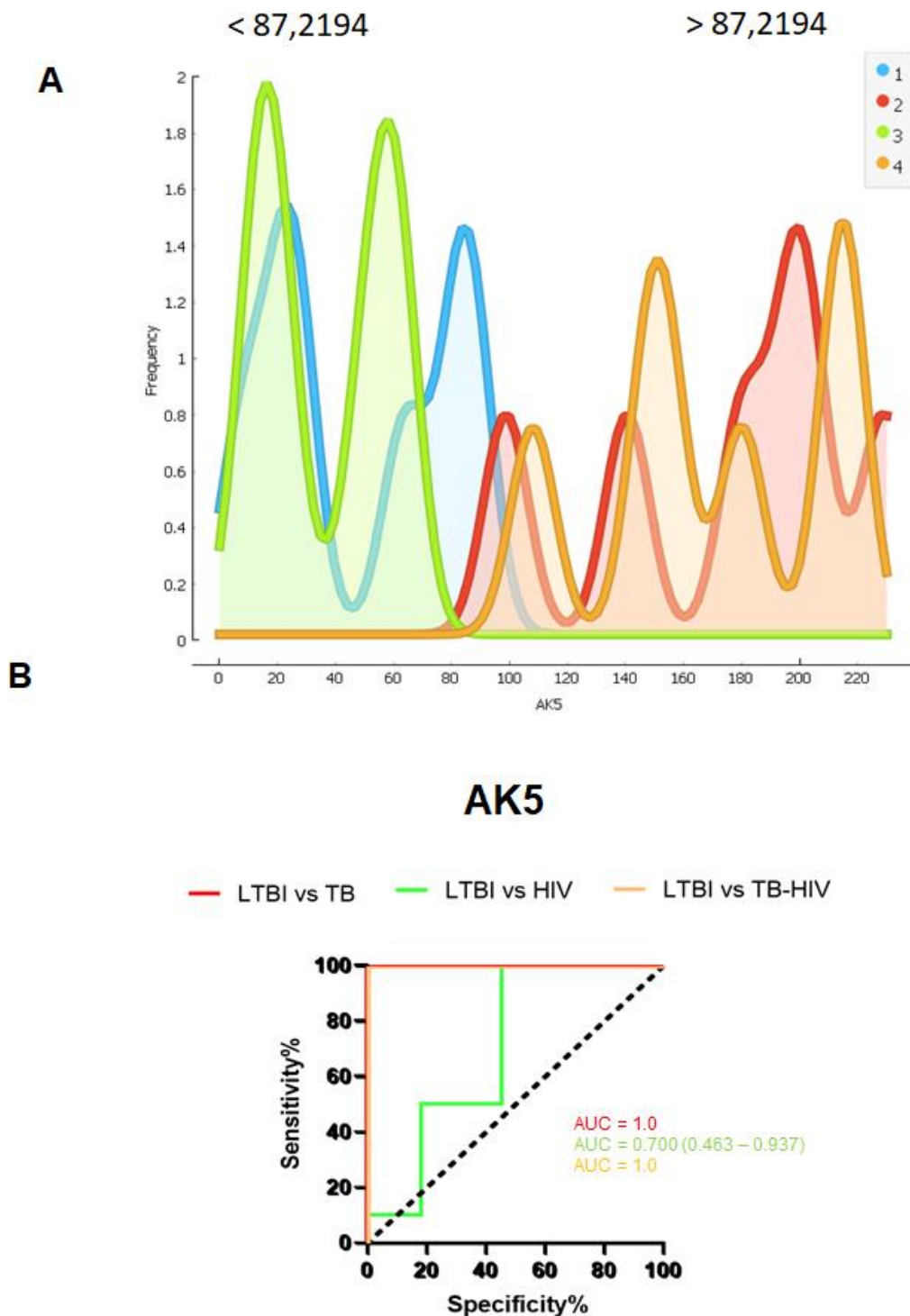


Figura 4. AK5 como possível biomarcador de infecção ativa por TB. **A** - Distribuição de densidade de Kernel para transcritos do gene AK5 nos grupos clínicos LTBI, TB, HIV e TB-HIV. **B** - Análise em Curva ROC para AK5 nos grupos estudados. Os dados mostram que AK5 é um possível biomarcador para a distinção dos indivíduos com infecção ativa por TB dos demais grupos (AUC = 1.0 para TB vs LTBI e TB-HIV vs LTBI). LTBI foi escolhido para as análises por apresentar valores semelhantes ao HIV nesta análise.

Como mostramos, AK5 permitiu distinguir os indivíduos com TB doença ativa daqueles com LTBI, porém não permite distinguir entre os casos de mono ou coinfeção, bem como não foi eficiente na separação entre os indivíduos com a infecção latente para o bacilo e aqueles mono infectados pelo vírus HIV.

Para analisar mais detalhadamente a presença de transcritos de genes associados tanto à atividade citotóxica quanto à disfunção de células T, na tentativa de elucidar os fenômenos presentes na patologia das infecções alvo deste estudo e nos padrões diferenciais que caracterizam cada grupo clínico, utilizamos a Projeção de FreeViz, que realiza a otimização dos dados por projeção linear em um gráfico de dispersão. Essa análise permite identificar, de forma exploratória, possíveis padrões e relações, contribuindo para a formulação de hipóteses de trabalho (DEMŠAR; LEBAN; BLAŽZUPAN, 2007) (Figura 5).

Nós identificamos a partir dessa projeção que, dentre os genes analisados, FAS e IL17A poderiam configurar bons marcadores de distinção a serem somados à AK5 na tentativa de identificação biológica dos diferentes grupos clínicos. Os indivíduos mono infectados com HIV apresentaram proporções significativamente reduzidas de FAS em relação à TB ($p < 0,0001$ - dados não mostrados) O padrão de distribuição dos indivíduos em relação ao vetor de IL17A permite distinguir os indivíduos TB dos TB-HIV, o que não foi possível com a análise de AK5 isoladamente, onde estes indivíduos permaneceram agregados. De forma semelhante, utilizando a expressão do gene FAS verificamos a segregação entre indivíduos HIV e LTBI (que permaneceram como um só grupo nas análises realizadas até aqui), além de distinguirmos os indivíduos HIV dos demais grupos (Figura 5 A).

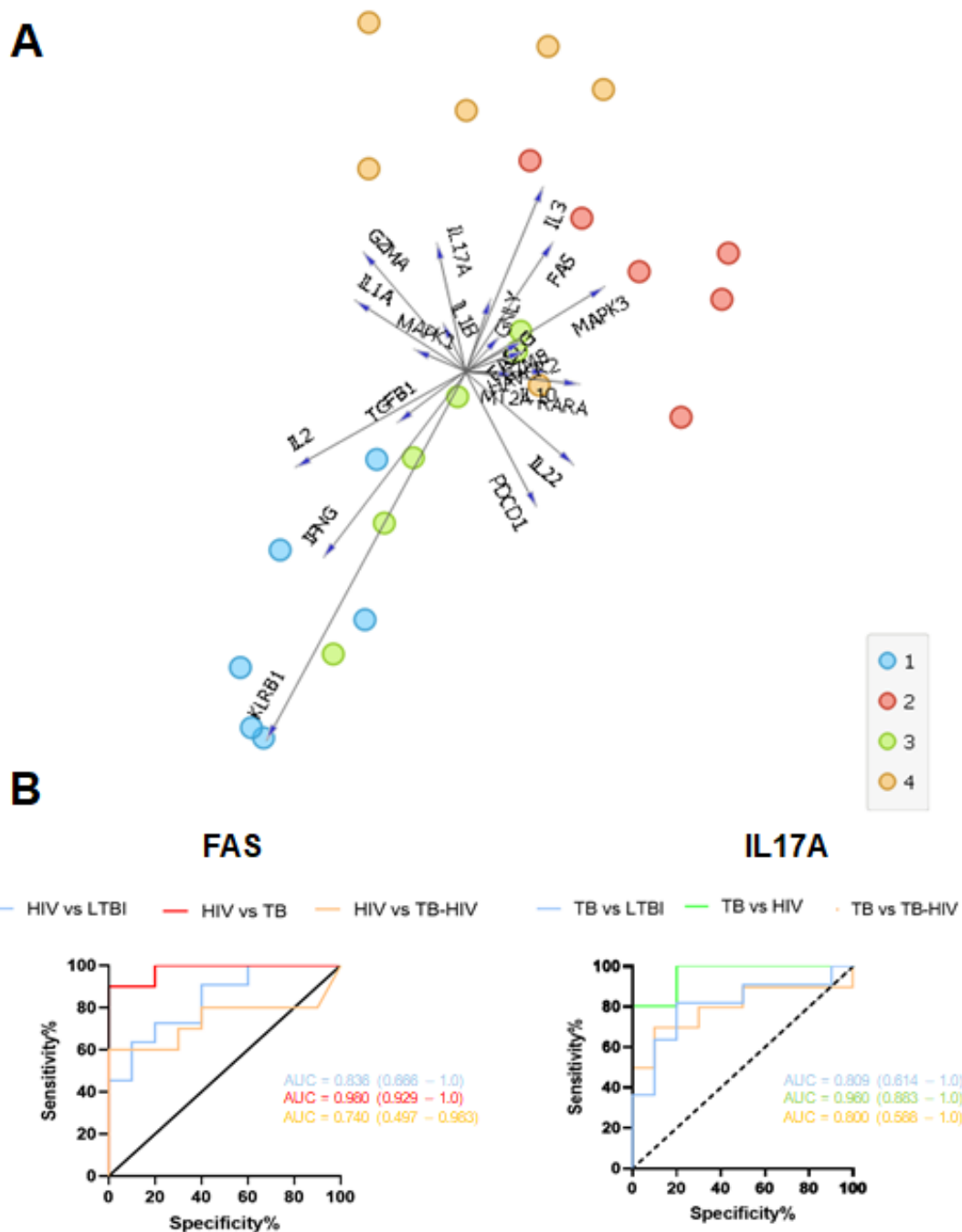


Figura 5. Genes como biomarcadores de distinção para entre tuberculose latente (LTBI), tuberculose ativa (TB), HIV e coinfeção TB-HIV. A - Projeção de FreeViz para os genes associados com a atividade citotóxica e disfunção de células T dos grupos clínicos analisados. **B -** Curva ROC de FAS e IL17A com a comparação dos grupos avaliados. Os resultados demonstram que FAS é um possível biomarcador para a distinção de HIV⁺, seja em mono ou coinfeção (AUC = 0.836 para HIV vs LTBI, 0.980 para HIV vs TB e 0.740 em HIV vs TB-HIV), enquanto que IL17A projeta-se como um biomarcador para a distinção entre os indivíduos monoinfectados ativamente com TB e os com infecção latente ou coinfectados TB-HIV (AUC = 0.809 e 0.960, respectivamente).

Os resultados obtidos para FAS e IL17A foram confirmados por análise em curva ROC. FAS foi capaz de promover a distinção de HIV em relação aos grupos sem infecção pelo vírus, LTBI e TB, contudo, mostrou-se menos capaz em distinguir os indivíduos com TB dos coinfectados com TB (Figura 5 B - gráfico à direita). Já a expressão de IL17A apresentou alta sensibilidade de distinção do grupo TB em relação a todos os grupos aqui avaliados (Figura 5 B - gráfico à esquerda).

Nossos resultados demonstram, portanto, ser possível reconhecer padrões de expressão gênica distintos entre os grupos clínicos estudados.

DISCUSSÃO

A análise da expressão gênica de biomarcadores vem sendo avaliada como possível estratégia para o desenvolvimento de metodologias alternativas de diagnóstico em doenças como a tuberculose tem sido amplamente realizada, especialmente nos últimos anos (ZHAO et al., 2020). A expressão diferencial de genes conforme a apresentação clínica em doenças infecciosas demonstra que os patógenos apresentam mecanismos de modulação não somente da resposta imune, mas de eventos que possam culminar com a sua eliminação (YARETA et al., 2020; KIDANE et al., 2013).

Aqui, nós demonstramos diferenças no nível de expressão de genes associados à função de linfócitos e de outros processos celulares ao compararmos LTBI, TB, HIV e TB-HIV. Além disso, as nossas análises revelaram semelhanças no padrão de modulação da expressão gênica em indivíduos mono infectados com TB e coinfectados com TB-HIV para a maioria dos genes avaliados.

Demonstramos anteriormente que os compartimentos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ apresentam perfis discordantes entre grupos com diferentes apresentações clínicas da TB (SANTANA et al.¹ - dados não publicados). De forma semelhante ao observado aqui, altas proporções de células T de memória central foram encontradas para o grupo dos coinfectados, onde destacamos anteriormente a emergência do compartimento Tcm CD8⁺HLA-DR⁺, como potencial marcador celular para a distinção destes indivíduos.

O fenótipo de ativação de linfócitos também parece ser alterado durante a infecção por TB (SILVEIRA-MATOS et al., 2020; AMELIO et al., 2019). A TB ativa, seja em mono ou coinfeção, aparentemente contribui para um fenótipo mais exaurido

destas células, ao mesmo tempo que nelas a presença de moléculas indicativas de atividade citotóxica também é maior (TONACO et al., 2017). Neste trabalho, observamos que os pacientes TB e TB-HIV apresentaram maior proporção geral para os transcritos relacionados ao desenvolvimento, ativação e exaustão de linfócitos, o que corrobora com a hipótese de que nestes indivíduos haja a necessidade de resposta contínua do sistema imunológico. A similaridade apresentada por esses grupos na análise de hierarquização foi confirmada por análise de componentes principais.

Dentre as avaliações das moléculas associadas aos processos de expansão e ativação linfocitária, TB e TB-HIV demonstraram proporções significativamente distintas de transcritos de AK5 (adenilato quinase). A função de AK5 está relacionada à obtenção de energia pela célula, participando como intermediário da via de sinalização AMPK. As adenilato quinases mostram-se importantes moduladoras em doenças nas quais o estresse oxidativo é fundamental para a patogênese, como síndromes metabólicas, doenças neurodegenerativas e câncer (IONESCU, 2019; ZHANG et al., 2019). Essa molécula foi recentemente associada com inibição da morte celular apoptótica e promoção da autofagia, contribuindo para mecanismos patofisiológicos em doenças como o câncer (ZHANG et al., 2019).

Nas nossas análises, observamos maior proporção de transcritos para o gene AK5 em pacientes TB e TB-HIV. Essa molécula mostrou possível aplicabilidade como biomarcador para a distinção de indivíduos com tuberculose ativa, independente de mono ou coinfeção com HIV. Entretanto, a separação entre os dois grupos com doença tuberculosa ativa não foi possível com esse gene. Essa distinção somente foi obtida adicionando-se a análise da proporção de transcritos para IL17A, mais elevada em indivíduos coinfectados TB-HIV que em indivíduos monoinfectados. IL17A foi anteriormente associada a uma forte resposta imunológica frente à TB, com participação de IFNG (KAMAKIA et al., 2017; TATEOSIAN et al., 2017).

Os indivíduos LTBI apresentaram padrão de expressão geral reduzido, apenas um pouco mais elevado em alguns genes do que o observado para HIV. Encontramos as maiores quantidades de mRNA para STAT3 e IFNG em LTBI. O IFNG participa dos eventos que levarão à ativação de células imunológicas (WANG et al., 2019) e o STAT3 está associado à transcrição de fatores para a geração de T CD8⁺ de memória (DUNN et al., 2015; ZHOU E XUE, 2012; CUI ET AL., 2011). A maior presença destas

moléculas em LTBI sugerem sua importância para a montagem de uma resposta imunológica eficiente.

Em relação à coinfeção com HIV, FAS (CD95) demonstrou ser um possível marcador para distinguir esses indivíduos daqueles monoinfectados com TB. Na literatura, os pacientes HIV⁺ apresentam elevada expressão de FAS, a qual está correlacionada com alta carga viral (GOURGEON et al., 2006; MOIR et al., 2004). Entretanto, os nossos pacientes apresentam em sua grande maioria doença com relativa preservação do quadro imunológico, sendo ou indivíduos recém-diagnosticados tanto para a tuberculose como para a coinfeção, ou indivíduos HIV com controle da carga viral em níveis indetectáveis, ou ainda indivíduos HIV estabilizados por uso de medicação antirretroviral.

CONCLUSÃO

Pacientes com tuberculose latente, tuberculose ativa, monoinfectados com HIV e coinfectados TB-HIV apresentam diferentes padrões de expressão gênica associados à resposta imune. Altas proporções de células de memória central foram encontradas para o grupo dos coinfectados e a distinção dos grupos clínicos pode ser realizada com base em padrões de transcrição em AK5, FAS e IL17A. Verificamos aqui, um padrão consistente com uma forte ativação e exaustão de linfócitos nos grupos com doença tuberculosa ativa, incluindo a coinfeção.

REFERÊNCIAS

ALAM, A. et al. Human gene expression profiling identifies key therapeutic targets in tuberculosis infection: A systematic network meta-analysis, **Infection, genetics and evolution**, v. 87, 2021.

AMELIO, P. et al. HIV infection functionally impairs Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 and CD8 T-cell responses. **Journal of virology**, v. 93, n. 5, p. e01728-18, 2019.

CUI, W. et al. An Interleukin-21- Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8⁺ T Cells. **Immunity**. v. 35, n. 5, p. 792-805, 2011.

DOMÍNGUEZ, J.; LATORRE, I. e SANTIN, M. Diagnóstico y abordaje terapéutico de la infección tuberculosa latente. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 5, p. 302-311, 2018.

DUNN, J. et al., Multi-layered epigenetic mechanisms contribute to transcriptional memory in T lymphocytes. **BMC Immunology**. v. 16, n. 27, 2015.

DUTTA, N. K. et al. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals novel biomarkers in the blood for tuberculosis diagnosis in children. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

GOURGEON, M. L. et al. HIV, Cytokines and Programmed Cell Death: A Subtle Interplay. **Annals of The New York Academy of Science**, v. 926, n. 1, p. 30–45, 2006.

IONESCU, M. I. Adenylate Kinase: A Ubiquitous Enzyme Correlated with Medical Conditions. **The Protein Journal**, v. 38, p.120-133, 2019.

KAFOROU, M. et al. Detection of tuberculosis in HIV-infected and-uninfected African adults using whole blood RNA expression signatures: a case-control study. **PLoS medicine**, v. 10, n. 10, p. e1001538, 2013.

KAMAKIA, R. et al. Potential biomarkers associated with discrimination between latent and active pulmonary tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 21, n. 3, p. 278-285, 2017.

KIDANE, Y. H.; LAWRENCE, Christopher; MURALI, T. M. The landscape of host transcriptional response programs commonly perturbed by bacterial pathogens: towards host-oriented broad-spectrum drug targets. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58553, 2013.

LAU, S.KP et al. Metabolomic profiling of plasma from patients with tuberculosis by use of untargeted mass spectrometry reveals novel biomarkers for diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 12, p. 3750-3759, 2015.

MANDAL, R. K. et al. Uma meta-análise sequencial experimental de ifn- γ +874 A>T (rs2430561) risco de polimorfismo genético e risco extrapulmonar de tuberculose.

Microbial pathogenesis, v. 130, p.1-9, 2019.

MOIR, S. et al., Decreased Survival of B Cells of HIV-viremic Patients Mediated by Altered Expression of Receptors of the TNF Superfamily. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 5, p. 587–600, 2004.

MONGA, S. et al. Clinical study of extrapulmonary head and neck tuberculosis in an urban setting. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 37, p. 493-499, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE OMS. **Global Tuberculosis Report**. 20^a Edição, 2021a, 297 p.

_____ OMS. Consensus meeting report: development of a target product profile (TPP) and a framework for evaluation for a test for predicting progression from tuberculosis infection to active disease. World Health Organization, 2017.

_____ OMS. High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting. WHO/HTM/TB/2014.18. Geneva, Switzerland: WHO, 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/135617>. Accessed October 2021.

QIU, B. et al. Evaluation of cytokines as a biomarker to distinguish active tuberculosis from latent tuberculosis infection: a diagnostic meta-analysis. **BMJ open**, v. 10, n. 10, p. e039501, 2020.

SAI, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. **Microbiol Spect**, v. 7, n. 4, 2019.

SILVEIRA-MATOS, P. S. et al. Differential Expression of Activation Markers by *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ T Cell Distinguishes Extrapulmonary From Pulmonary Tuberculosis and Latent Infection. **Clinical infectious disease**, v. 71, n. 8, p. 1905-1911, 2020.

SIVAKUMARAN, D. et al. Host blood RNA transcript and protein signatures for sputum-independent diagnostics of tuberculosis in adults. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 3795, 2020.

SUDBURY, E. L. et al. Mycobacterium tuberculosis-specific cytokine biomarkers to differentiate active TB and LTBI: A systematic review. **Journal of Infection**, 2020.

TATEOSIAN, N. L. et al. IL17A augments autophagy in Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes from patients with active tuberculosis in association with the severity of the disease. **Autophagy**, v. 13, n. 7, p. 1191-1204, 2017.

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

TORNHEIM, J. A. et al. Transcriptomic profiles of confirmed pediatric tuberculosis patients and household contacts identifies active tuberculosis, infection, and treatment response among Indian children. **The Journal of infectious diseases**, v. 221, n. 10, p. 1647-1658, 2020.

UPADHYAY, S.; MITTAL, E. e PHILIPS, A. Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. **Pathogens and Disease**, v. 76, 2018.

WANG, S. et al. Transcriptional Profiling of human peripheral blood mononuclear cells identifies diagnostic biomarkers that distinguish active and latent tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-11, 2019.

WU, J. et al. Multiple cytokine responses in discriminating between active tuberculosis and latent tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v. 102, p. 68-75, 2017.

YARETA, J. et al. Differential expression of circulating micro-RNAs in patients with active and latent tuberculosis. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 37, p. 51-56, 2020.

ZHANG L.H. AK5, a novel prognosis marker, inhibits apoptosis and promotes autophagy as well as proliferation in human gastric cancer. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 23, p. 9900-9906, 2019.

ZHANG, F. D. et al. Diagnosis of latent tuberculosis by ELISPOT assay and tuberculin skin test. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 46, n. 3, p. 150-153, 2016

ZHAO, G. et al. Combining bioinformatics and biological detection to identify novel biomarkers for diagnosis and prognosis of pulmonary tuberculosis. **Saudi medical journal**, v. 41, n. 4, p. 351, 2020.

ZHOU, X.; XUE, H. Cutting Edge: Generation of Memory Precursors and Functional Memory CD8⁺ T Cells Depends on T Cell Factor-1 and Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1. **The Journal of Immunology**. v. 189, n. 6, p. 2722-2726, 2012.

9. DISCUSSÃO

A relação patógeno-hospedeiro é, de forma geral, bastante complexa e no contexto da tuberculose há importantes lacunas em muitos aspectos desse tema. A resposta à infecção micobacteriana é multifatorial, envolvendo desde a suscetibilidade genética e modulação da capacidade de resposta do hospedeiro, à adaptação e escape da micobactéria, através de sua autorregulação ou de efeitos sobre a biologia do hospedeiro (CORREA-MACEDO, CAMBRI e SCHURR, 2019; ABEL, et al., 2018; UPADHYAY; MITTAL; PHILIPS, 2018). Quando somados a fatores de risco adicionais, como nos casos da coinfeção TB-HIV, esse conjunto de fatores pode direcionar o hospedeiro para diferentes desfechos, implicando em vulnerabilidade ainda maior à progressão e piores quadros clínicos, e ainda com frequência culminando em óbito (OMS, 2021).

Em nosso trabalho, demonstramos que indivíduos monoinfectados com TB e coinfectados TB-HIV assemelham-se em muitos aspectos, relacionados ao perfil celular e molecular da resposta destes indivíduos. Demonstramos, por um lado, um perfil de resposta imunológica robusta nesses pacientes, pela presença de maiores proporções de T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando granzima B, contudo, associado a maior presença de moléculas relacionadas ao esgotamento (CD95) desses compartimentos celulares. De forma semelhante ao observado na avaliação celular, o perfil de expressão gênica em TB-HIV foi mais associado à presença de moléculas indicativas de expansão, diferenciação e ativação de linfócitos, mas com igual perfil exaurido.

Ressaltamos os nossos achados de aumento de expressão de transcritos de adenilato quinase 5, AK5, em pacientes TB e TB-HIV. A AK5 foi recentemente associada com inibição da morte celular apoptótica e promoção da autofagia, contribuindo para mecanismos patofisiológicos em doenças como o câncer (ZHANG et al., 2019). Em nossas observações esta molécula mostrou-se como potencial biomarcador para a distinção da TB ativa, independente de mono ou coinfeção. Observamos ainda que a discriminação de grupos do espectro clínico avaliado pode ser refinada com a avaliação da expressão de IL17A, que distinguiu indivíduos coinfectados com TB-HIV dos indivíduos monoinfectados. Chama a atenção também que essa citocina foi associada na literatura a uma forte resposta imunológica frente à TB, com participação de IFNG (KAMAKIA et al., 2017; TATEOSIAN et al., 2017).

LTBI tem sido associado a um espectro de resposta do indivíduo na ausência de doença, que varia desde uma apresentação subclínica a um estado quiescente da infecção (ref). Corroborando com essa caracterização, observamos diferentes perfis de composição de células T nos compartimentos celulares avaliados, quanto à presença de marcadores de ativação celular. Verificamos ainda que os indivíduos coinfetados com TB-HIV também apresentam perfil celular diverso, ora mais próximo daquele capaz de responder à infecção, ora mais identificado com exacerbação e persistência dos estímulos inflamatórios, o que poderia contribuir para dano nos tecidos do hospedeiro. Parte desses indivíduos apresentam um perfil que foi relacionado à presença de células HLA-DR⁺PD-1⁺ e com baixas proporções de CD95, aqui consideradas como potenciais células efetoras/regulatórias, enquanto que parte desses indivíduos apresentaram perfil com tendência à exaustão, mais próximo daquele apresentado por TB e TB-HIV. Esses resultados foram corroborados em nossas avaliações de expressão gênica, em que também encontramos alguns indivíduos LTBI hierarquizados junto a TB e TB-HIV, atestando a heterogeneidade de respostas presentes nesses indivíduos.

Em um contexto mais amplo, a transição entre os estados com e sem doença é influenciada pelo background genético do hospedeiro, que permite a modulação em maior ou menor grau dos mecanismos envolvidos na resistência ao bacilo. Em nossa análise exploratória da literatura para evidenciar como a variabilidade genética dos hospedeiros em genes relacionados à morte celular pode se refletir nessas diferentes apresentações clínicas em indivíduos infectados, evidenciamos uma rede de genes altamente interconectados, e frequentemente coexpressos, potencialmente afetados pela infecção micobacteriana e que podem estar diretamente implicados no equilíbrio entre a resposta imunológica do hospedeiro e a sobrevivência e multiplicação do bacilo. Aliados às nossas análises de perfil celular e de expressão gênica, esses resultados permitem evidenciar mecanismos a serem investigados na patogênese da tuberculose, e ressaltam a importância da modulação da resposta imune adaptativa e da morte celular para a sobrevivência da micobactéria tuberculosa no hospedeiro humano.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pacientes LTBI, TB e TB-HIV possuem diferentes perfis de ativação. Entre indivíduos com LTBI e com TB-HIV podem ser distinguidos também subgrupos, com potenciais implicações clínicas, caracterizados por diferentes proporções de células positivas para HLA-DR, PD-1, GRZB e CD95, além de padrões de expressão gênica distintos. Reconhecemos um perfil efetor/regulador que pode ser associado a uma resposta imune efetora controlada, e um perfil relacionado com atividade citotóxica, especialmente mediada por células TCD8⁺, potencialmente exagerada e deletéria. A expressão de genes associados às vias de morte celular é modulada em presença da infecção tuberculosa em uma rede de interações marcantes e altamente interconectadas, cuja perturbação pode constituir uma oportunidade para o escape do bacilo aos mecanismos de controle da infecção.

Observamos também maior presença de linfócitos de memória central em indivíduos coinfectados, tanto em análises de expressão gênica, quanto através da avaliação do perfil de ativação celular por citometria de fluxo. Chamamos a atenção para a maior contribuição de Tcm CD8⁺HLA-DR⁺ em indivíduos coinfectados TB-HIV em relação aos demais grupos clínicos.

Tcm CD8⁺HLA-DR⁺, bem como AK5, FAS e IL17A foram apontados como possíveis biomarcadores para a distinção dos grupos estudados.

Nossos resultados representam novas evidências sobre o perfil de linfócitos T e de expressão gênica em diferentes apresentações clínicas da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, W. *et al.* Blockade of BFA-mediated apoptosis in macrophages by the HIV-1 Nef protein. **Cell Death and Disease**, v. 5, e1080, 2014.
- ADAM, L. *et al.* Role of apoptosis and autophagy in Tuberculosis. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 1, n. 313, p. 218-229, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/28495854/>>, acesso em: 19 nov. 2019.
- ADDO, M. M. *et al.* Fully differentiated HIV-1 specific CD8⁺ T effector cells are more frequently detectable in controlled than in progressive HIV-1 infection, **PLoS One**, v. 2, 2007.
- AGRAWAL, N. *et al.* Dissecting host factors that regulate the early stages of tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v.100, p. 102-113, 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472979215302596?via%3DiHub>>, acesso em: 19 mar. 2020.
- AGUILÓ, N. *et al.* Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by Mycobacterium tuberculosis. **Cell Death and Disease**, v. 5, e1343, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/25032866/>>, acesso em: 17 nov. 2019.
- AHLUWALIA, P. K. *et al.* Perturbed microrna expression by Mycobacterium tuberculosis Promotes Macrophage Polarization leading to Pro-survival Foam cell. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 107, 2017 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5296369/>>, acesso em: 26 mai. 2020.
- AHMED, A.; RAKSHIT, S.; VYAKARNAM, S. HIV–TB co-infection: mechanisms that drive reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV infection. **Oral Diseases**, v. 22, p. 53-60, 2016.
- AMARAL, E. P. *et al.* A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis–induced cell death and tissue necrosis, **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 3, p. 556–570, 2019. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/216/3/556/120345/A-major-role-for-ferroptosis-in-Mycobacterium>>, acesso em: 28 mar 2020.
- AMARAL, E. P., LASUNSKAIA, E. B. e D'IMPÉRIO-LIMA, M. R. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. **Microbes and Infection**, v. 18, p. 11-20, 2016. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286-4579\(15\)00187-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286-4579(15)00187-2)>, acessado em: 18 nov. 2019.
- APPAY, V. *et al.* Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues. **Cytometry Part A**, v. 73^a, p. 975-983, 2008;

- ARAÚJO, M. S. *et al.* No evidence of association between MBL2A/O polymorphisms and *Mycobacterium tuberculosis* infection in populations from the Brazilian Amazon region. **Human Immunology**, v. 74, p. 82–84, 2013.
- ARMED, A.; RAKSHIT, S. e VYAKARNAM, A. HIV–TB co-infection: mechanisms that drive reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV infection. **Oral Diseases**, v. 22, p. 53–60, 2016.
- ARNETT, E. *et al.* PPAR γ is critical for *Mycobacterium tuberculosis* induction of Mcl-1 and limitation of human macrophage apoptosis, **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, e1007100, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007100>>, acesso em: 28 mar. 2020.
- ARRUVITO, L. *et al.* Identification and Clinical Relevance of Naturally Occurring Human CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells. **Journal of Immunology**, v. 193, p. 4469-4476, 2014.
- BAI, R. *et al.* Using cytometric bead arrays to detect cytokines in the serum of patients with different types of pulmonary tuberculosis. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 33, p.1–5, 2019.
- BEHAR, S. M. e BRIKEN, V. Apoptosis inhibition by intracellular bacteria and its consequence on host immunity, **Current Opinion in Immunology**, v. 60, p. 103–110, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.05.007>>, acesso em: 28 mar. 2020.
- BEHAR, S. M. Antigen-Specific CD8⁺ T Cells and Protective Immunity to Tuberculosis. **Advanced Experimental Medicine and Biology**, v. 783, p. 141–163, 2013.
- BEIRANVANDA, E. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of IFN γ (+874 A/T) and IFN γ R1 (–56 C/T) in Iranian patients with TB, **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 10, p. 604-60, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1093/trstmh/trw074>>, acesso em: 12 jun. 2020.
- BELL, L. C.; NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80-90, 2018.
- BELL, L. C. K. e NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection, **Natural Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80-90, 2018. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.128>>; acessado em: 11 jun. 2020.
- BHAVANAM, S. *et al.* Understanding the pathophysiology of the human TB lung granuloma using in vitro granuloma models *Future Microbiology*, v. 11, p. 1073-89, 2016 Disponível em: < http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb-2016-0005?url_ver=Z39.88-003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed>; acessado em: 23 mai. 2020.

- BOMAN, G. The on-going story of the Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination. **Acta Paediatrica**, v. 105, n. 12, p. 1417-1420, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apa.13585>>; acessado em: 16 mar. 2020.
- BRACE, P. T. *et al.* Mycobacterium tuberculosis subverts negative regulatory pathways in human macrophages to drive immunopathology, **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 6, e1006367, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006367>>; acessado em: 24 mai. 2020
- BRIGHENTI, S.; ANDERSSON, J. Induction and regulation of CD8⁺ cytolytic T cells in human tuberculosis and HIV infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p.50–57, 2010.
- BRIKEN, V. Mycobacterium tuberculosis Genes Involved in Regulation of Host Cell Death *in* DIVANGAHI, M. The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 783, p. 93-102, 2013. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_5>; acessado em: 21 nov. 2019.
- BUSSI, C. e GUTIERREZ, M. G. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 4, p. 341-361, 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/30916769/>>; acessado em: 25 mai. 2020.
- CACCAMO, N. *et al.* Atypical Human Effector/Memory CD4⁺ T Cells With a Naive-Like Phenotype. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2832, 2018.
- CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M. e FLYNN, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. **Natural Reviews in Immunology**, v. 17, n. 11, p. 691–702, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/28736436/> >; acessado em: 15 mai. 2020.
- CAIN, K. P. *et al.* Causes of death in HIV-infected persons who have tuberculosis, Thailand, **Emerging infectious diseases**, v. 15, 2009.
- CAMBIER, C. J.; FALKOW, S. e RAMAKRISHNAN, L. Host Evasion and Exploitation Schemes of Mycobacterium tuberculosis. **Cell**, v. 159, n. 7, p. 1497-1509, 2014. Disponível em: < [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)01501-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414015013%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)01501-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867414015013%3Fshowall%3Dtrue)>; acessado em: 26 mai. 2020.
- CANADAY, D. H. *et al.* CD4⁺ T cell polyfunctional profile in HIV-TB coinfection are similar between individuals with latent and active TB infection. **Tuberculosis**, v. 95, n. 4, p. 470-475, 2015.
- CHANG, S. *et al.* SP110 Polymorphisms Are Genetic Markers for Vulnerability to Latent and Active Tuberculosis Infection in Taiwan, **Disease Markers**, v. 2018, n. 4687380, 12p. 2018; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6304864/>>; acessado em: 28 mar. 2020.

CHEE, C. B. *et al.* Latent tuberculosis infection: Opportunities and challenges. **Respirology**, v. 23, n. 10, p. 893-900, 2018.

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, e1000392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19381260/> >; acessado em: 11 jun. 2020.

CHEN, M; GAN, H. e REMOLD, H. G. A Mechanism of Virulence: Virulent Mycobacterium tuberculosis Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis. *The Journal of Immunology*, v. 176, p. 3707-3716, 2006. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/176/6/3707> >; acessado em: 15 nov. 2019.

CICCHESE, J. M. *et al.* Dynamic balance of pro- and anti-inflammatory signals controls disease and limits pathology. **Immunology Reviews**, v. 285, n. 1, p. 147–167, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6292442/> >; acessado em: 23 mai. 2020.

CILFONE, N. A. *et al.* Computational Modeling Predicts Interleukin-10 Control of Lesion Sterilization By Balancing Early Host-Immunity-Mediated Antimicrobial Responses With Caseation During Mycobacterium tuberculosis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 2, p. 664–677, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4283220/>>; acessado em: 24 mai. 2020.

CILFONE, N. A. *et al.* Multi-Scale Modeling Predicts a Balance of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Controls the Granuloma Environment during Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, e68680, 2013. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068680> >; acessado em: 24 mai. 2020.

CORREA-MACEDO, W.; CAMBRI, G. e SCHURR, E. The Interplay of Human and Mycobacterium Tuberculosis Genomic Variability. *Frontiers in Genetics*, v. 10, n. 865. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00865/full>>; acessado em: 29 mar. 2020.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R. e RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, p. 641-76, 2003. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00865/full>>; acessado em: 18 mar. 2020.

COUNOUPAS, C. e TRICCAS, J. A. The generation of T-cell memory to protect against tuberculosis. **Immunology & Cell Biology**, p. 1–8 2019.

CUMMING, B. M. *et al.* Mycobacterium tuberculosis induces decelerated bioenergetic metabolism in human macrophages. **eLife**, v. 7, e39169, 2018. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/39169>>, acesso em: 26 mai. 2020.

DAI, Y. *et al.* MTB driven B cells producing IL-35 and secreting high level of IL-10 in the patients with active pulmonary tuberculosis. **Molecular Immunology**, v. 112, p. 175–181, 2019. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161-5890\(19\)30131-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161-5890(19)30131-2)>, acesso em: 24 mai. 2020.

DALLENKA, T. *et al.* M. tuberculosis-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. **Cell Host & Microbe**, v. 22, p. 519–530, 2017.

DANIEL, J. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-Like Phenotype in Lipid-Loaded Macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 6, e1002093, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3121879/>>, acesso em: 26 mai. 2020.

DANTAS, N. G. T. *et al.* Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 306, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4521345/>>, acesso em: 28 mar. 2020.

DATTA, M. *et al.* Mathematical Model of Oxygen Transport in Tuberculosis Granulomas. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 44, n. 4, p. 863–872, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4795989/>>, acesso em: 26 mai. 2020.

DAVIS, J. M. e RAMAKRISHNAN, L. The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. **Cell**, v. 136, p. 37–49, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3134310/>>, acesso em: 20 mar. 2020.

DAVOUDI, S. *et al.* CD4⁺ Cell Counts in Patients with Different Clinical Manifestations of Tuberculosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 483-486, 2008.

DAY, C. L. *et al.* Detection of Polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis*-Specific T Cells and Association with Viral Load in HIV-1-Infected Persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 990-999, 2008.

DAY, C. L. *et al.* Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2222–2232, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159795/>>, acesso em: 24 mai. 2020.

DAY, C. L. *et al.* Patients with Tuberculosis Disease Have Mycobacterium tuberculosis-Specific CD8 T Cells with a Pro-Apoptotic Phenotype and Impaired Proliferative Capacity, Which Is Not Restored following Treatment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, e94949, 2014.

DAY, C. L. *et al.* PD-1 Expression on Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4 T Cells Is Associated With Bacterial Load in Human Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1995, 2018.

DE ALMEIDA, A. L. *et al.* RD (Rio) Mycobacterium tuberculosis lineage in the Brazil/Paraguay/Argentina triple border. **Tuberculosis**, v. 110, p. 68-78, 2018.
Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472979217303876?via%3Dihub>>, acesso em: 28 mar. 2020.

DENG, J. *et al.* Accumulation of EB13 induced by virulent Mycobacterium tuberculosis inhibits apoptosis in murine macrophages. **Pathogens and Disease**, v. 77, 2019.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6414311/>>;
acessado em: 11 jun. 2020.

DIERCKX, T. *et al.* IFN- β induces greater antiproliferative and proapoptotic effects and increased p53 signaling compared with IFN- α in PBMCs of adult T-cell Leukemia/Lymphoma patients. **Blood Cancer Journal**, v. 7, n. 1 e519, 2017.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5301034/>>;
acessado em: 16 mar. 2020.

DIVANGAHI, M. *et al.* Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Immunology**, v. 11, n. 8, 2010.

DIVANGAHI, M.; BEHAR, S. M.; REMOLD, H. Dying to Live: How the death modality of the infected macrophage modulates immunity to Tuberculosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 783, p. 103-120, 2013.

DLAMINI, Z. *et al.* Is targeting dysregulation in apoptosis splice variants in Mycobacterium tuberculosis (MTB) host interactions and splicing factors resulting in immune evasion by MTB strategies a possibility?. **Tuberculosis**, p. 101964, 2020.

DOMÍNGUEZ, J.; LATORRE, I. e SANTIN, M. Diagnóstico y abordaje terapéutico de la infección tuberculosa latente. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 5, p. 302-311, 2018. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X17303786?via%3Dihub>>; acessado em: 22 mai. 2020.

DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. E. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 153-166, 2015.

DRIERICH, C. R. *et al.* Reactivation of Latent Tuberculosis in Cynomolgus Macaques Infected with SIV Is Associated with Early Peripheral T Cell Depletion and Not Virus Load. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, e9611, 2010.

DRIERICH, C.R. *et al.* Relationship between HIV-1 co-infection, IL-10, and M. tuberculosis in human lymph node granulomas. **Journal of Infectious Diseases Advance**, 2016. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/early/2016/07/25/infdis.jiw313.long>>; acesso em: 26. Jul. 2016.

ELKINGTON, P. *et al.* In Vitro Granuloma Models of Tuberculosis: Potential and Challenges. **Journal of Infectious Diseases**, v. 219, p. 1858–1866, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6534193/>>; acessado em: 24 mai. 2020.

ETNA, M. P. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines in TB: A two-edged sword in TB pathogenesis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 543-551, 2014. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044-5323\(14\)00095-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044-5323(14)00095-5)>; acessado em: 23 mai. 2020.

FLYNN, J. L.; CHAN. J. Immunology of tuberculosis. **Annual Reviews in Immunology**, v. 19, p. 93–129, 2001.

FOREMAN, T. W. *et al.* CD4⁺ T-cell-independent mechanisms suppress reactivation of latent tuberculosis in a macaque model of HIV coinfection. **PNAS**, p. E5636–E5644, 2016.

FOX, G. J. *et al.* Polymorphisms of SP110 are associated with both pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis among the vietnamese. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, e99496, 2013.

FRAGA, A. G. *et al.* Immune-evasion strategies of mycobacteria and their implications for the protective immune response. **Current issues in molecular biology**, v. 25, n. 1, p. 169-198, 2018.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. F. *et al.* Extrapulmonary tuberculosis: epidemiology and risk factors. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 7, p. 502–509, 2011. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213-005X\(11\)00125-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213-005X(11)00125-X)>; acessado em: 22 mai. 2020.

GATTINONI, L. *et al.* A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. **Natural Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1290–1297, 2012

GETAHUN, H. *et al.* Latent Mycobacterium tuberculosis infection. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 22, p. 2127-2135, 2015.

GIDEON, H. P. *et al.* Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists, but a Balance of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines Is Associated with Sterilization. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, e1004603, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4303275/>>; acessado em: 23 mai. 2020.

GONG, Z. *et al.* Regulation of host cell pyroptosis and cytokines production by Mycobacterium tuberculosis effector PPE60 requires LUBAC mediated NF-κB signaling. **Cellular Immunology**, v. 335, p. 41–50, 2019. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008-8749\(18\)30345-9](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008-8749(18)30345-9)>; acessado em: 17 nov. 2019.

GOUGEON, M. L.; MONTAGNIER, L. Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 887, p. 199-212, 1999.

GRACE, P. S. e ERNST, J. D. Suboptimal antigen presentation contributes to virulence of *M. tuberculosis* in vivo. **Journal of Immunology**, v. 196, n. 1, p. 357-364 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4684992/>>; acessado em: 25 mai. 2020.

GROTZKE, J. E. e LEWINSOHN, D. M. Role of CD8⁺ T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 776–788, 2005.

GROVER, S. *et al.* The PGRS Domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS Protein Rv0297 Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis through Toll-Like Receptor 4. **mBio**, v. 9, n. 3, p. e01017-18, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6016250/>>; acessado em: 16 nov. 2019.

GUGLIELMETTI, L. *et al.* Lymphocyte subpopulations in active tuberculosis: association with disease severity and the QFT-GIT assay. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.17, p. 825-828, 2013.

GUIRADO, E. *et al.* Characterization of Host and Microbial Determinants in individuals with Latent Tuberculosis Infection Using a Human Granuloma Model. **mBio**, v. 6, n. 1, p. e02537-14, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4337582/>>; acessado em: 23 mai. 2020.

GURUNATHAN, S. *et al.* Use of predictive markers of HIV disease progression in vaccine trials. **Vaccine**, v. 27, n. 14, p. 1997–2015, 2009. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264-410X\(09\)00137-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264-410X(09)00137-6)>; acessado em: 20 out. 2010.

HAAS, M. K.; BELKNAP, R. W. Diagnostic tests for latent tuberculosis infection. **Clinics in chest medicine**, v. 40, n. 4, p. 829-837, 2019.

HARRIFF, M. J.; PURDY, G. E. e LEWINSOHN, D. M. Escape from the phagosome: the explanation for MHC-I processing of mycobacterial antigens? **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 40, 2012. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00040/full>>; acessado em: 19 jun. 2020.

HE, X.-Y. *et al.* T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 29, p. 643–650, 2010.

HERBEIN, G. e VARIN, A. The Macrophage in HIV-1 Infection: From Activation to Deactivation? **Retrovirology**, v. 7, n. 33, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2859752/>>; acessado em: 10 mai. 2020.

HERTOGHE, T. *et al.* T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 1, n. 1, 2000.

HIRSCH, C. S. *et al.* Expansion and productive HIV-1 infection of Foxp3 positive CD4 T cells at pleural sites of HIV/TB co-infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 122, p. 350-357, 2016.

HONG, E. P. *et al.* Risk prediction of pulmonary tuberculosis using genetic and conventional risk factors in adult Korean population. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, e0174642, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174642>>; acessado em: 28 mar. 2020.

HOSSEINI, R. *et al.* Efferocytosis and extrusion of leukocytes determine the progression of early mycobacterial pathogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 129, p. 3385-3395, 2016. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=27469488>>; acessado em: 11 jun. 2020.

HUANG, L. *et al.* Growth of Mycobacterium tuberculosis in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 4, p. 1135–1152, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.20172020>>, acessado em: 25 mai. 2020.

HUANG, L.; NAZAROVA, E. V.; RUSSEL, D. G. Mycobacterium tuberculosis: Bacterial fitness within the host macrophage. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6459685/>>, acessado em: 26 mai. 2020.

HUANG, Z. *et al.* Mycobacterium tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129744, 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0129744>>; acessado em: 15 mar. 2020.

IONESCU, M.II. Adenylate kinase: a ubiquitous enzyme correlated with medical conditions. **The protein journal**, v. 38, n. 2, p. 120-133, 2019.

JACOBSEN, M. *et al.* Clonal Expansion of CD8 Effector T Cells in Childhood Tuberculosis. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 1331-1339, 2007.

JASENOSKY, L. D. *et al.* T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. **Immunological Reviews**, v. 264, p. 74–87, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imr.12274>>, acessado em: 20.mar. 2020.

JEONG, Y. H. *et al.* Differentiation of Antigen-Specific T Cells with Limited Functional Capacity during Mycobacterium tuberculosis Infection. **Infection and Immunity**, p. 132–139, 2014.

JIANG, H. *et al.* Decreased expression of perforin in CD8⁺ T lymphocytes in patients with Mycobacterium tuberculosis infection and its potential value as a marker for efficacy of treatment. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, n. 5, p. 1353-1360, 2017.

JIN, H.-T. *et al.* Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. **BMB reports**, p. 217- 231, 2011.

JOSHI, L. *et al.* Association of TNF- α , IL-10 and IL-6 Promoter Polymorphisms in Pulmonary Tuberculosis Patients and Their Household Contacts of Younger Age Group. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, p. 20-26, 2017. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147-9571\(17\)30097-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147-9571(17)30097-8)>, acessado em: 25.mar. 2020.

JÚAREZ-ORTEGA, M. *et al.* Sera from patients with active pulmonary tuberculosis and their household contacts induce nuclear changes in neutrophils. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1685–1702, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6188193/>>, acessado em: 21 nov. 2019.

KAMAKIA, R. *et al.* Potential biomarkers associated with discrimination between latent and active pulmonary tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 21, n. 3, p. 278-285, 2017.

KAPOOR, N. *et al.* Human Granuloma In Vitro Model, for TB Dormancy and Resuscitation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, e53657, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3538642/>>, acessado em: 25 mai. 2020.

KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature reviews of immunology**, v.1, p. 20-30, 2001.

KAVATHIA, N.; JAIN, A.; WALSTON, J.; BEAMER, B.A.; FEDARKO, N. S. Serum markers of apoptosis decrease with age and cancer stage. **Aging**, v.1, p. 652–663, 2009.

KEIPER, M. D. *et al.* CD4 T Lymphocyte Count and the Radiographic Presentation of Pulmonary Tuberculosis: A Study of the Relationship Between These Factors in Patients With Human Immunodeficiency Virus Infection. **Chest**, v. 107, n. 1, p. 74-80, 1995.

KHAN, A. *et al.* Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 275-282, 2019. Disponível em: <<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/JLB.MR0318-095RR>>, acessado em: 07 jun. 2020.

KHAN, N. *et al.* T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects. **Critical Reviews in Microbiology**, 2016

KIM, M. *et al.* Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 258–274, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/20597103/>>, acessado em: 24 mai. 2020.

KRAMNIK, I. e BEAMER, G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, p. 221–237, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4779126/>>, acessado em: 24 mai. 2020.

- KROON, E. E. *et al.* Neutrophils: Innate Effectors of TB Resistance? **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2637, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02637/full>>, acessado em: 24 mai. 2020.
- LAWN, D. S; BUTERA, S.T; SHINNICK, T.M. Tuberculosis unleashed: the impact of human immunodeficiency virus infection on the host granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**, v.4, p.635–646, 2002.
- LEE, J. *et al.* Characterisation of genes differentially expressed in macrophages by virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis* through RNA-Seq analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4027, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC30858471/>>; acessado em: 28 mar. 2020.
- LENAERTS, L.; BARRY-III, C. E. e DARTOIS, V. Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses. **Immunological Reviews**, v. 264, p. 288–307, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4368385/>>; acessado em: 24 mai. 2020.
- LI, H. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* PE13 (Rv1195) manipulates the host cell fate via p38-ERK-NF- κ B axis and apoptosis. **Apoptosis**, v. 21, n. 7, p. 795-808, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10495-016-1249-y>>; acessado em: 16 nov. 2019.
- LIM, H.-J. *et al.* CD4 α FoxP3 β T regulatory cells in drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 93, 523e528, *Seminars in Immunopathology*, v. 37, n. 3, 239–249, 2013.
- LIN, J. *et al.* Early secreted antigenic target of 6-kDa of *Mycobacterium tuberculosis* promotes caspase-9/caspase-3-mediated apoptosis in macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 457, p.179–189, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3947310/>>; acessado em: 15 nov. 2019.
- LIN, J. N. *et al.* Risk factors for extra-pulmonary tuberculosis compared to pulmonary tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 5, p. 620-625, 2009. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/openurl?genre=article&issn=1027-3719&volume=13&issue=5&page=620&aulast=Lin>>; acessado em: 22 mai. 2020.
- LIN, P. L. e FLYNN, J. L. CD8 T cells and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Seminars in Immunopathology*, v. 37, n. 3, p. 239–249, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439333/>>; acessado em: 20 mar. 2020.
- LIN, P. L. *et al.* Sterilization of granulomas is common in both active and latent tuberculosis despite extensive within-host variability in bacterial killing. **Nature Medicine**, v. 20, n. 1, p. 75-79, 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3947310/>>; acessado em: 24 mai. 2020.

LODDENKEMPER, R.; LIPMAN, M. e ZUMLA, A. Clinical Aspects of Adult Tuberculosis. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 6, n. 1, a017848, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4691808/>>; acessado em: 22 mai. 2020.

LOXTON, A. G. B cells and their regulatory functions during Tuberculosis: Latency and active disease. **Molecular Immunology**, v. 111, p. 145–151, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589018308708>>; acessado em: 24 mai. 2020.

LY, L. H.; RUSSEL, M. I. e McMYRRAY, D. N. Cytokine Profiles in Primary and Secondary Pulmonary Granulomas of Guinea Pigs with Tuberculosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 455-462, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/18032570/>>; acessado em: 24 mai. 2020.

LYADOVA, I. V. Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way? **Hindawi Mediators of Inflammation**, v. 2017, n. 8619307, 11 p., 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/8619307/>>; acessado em: 24 mai. 2020.

MACHICOTE, A. *et al.* Human CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells, Similarly to Classical CD4⁺Foxp3⁺ Cells, Suppress Immune Responses via PD-1/PD-L1 Axis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2788, 2018.

MAHAMED, D. *et al.* Intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. **Elife**, v. 6, e22028, 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/8619307/>>; acessado em: 11 jun. 2020.

MAHNKE, Y. D. *et al.* The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. **European Journal of Immunology**, v. 43, p. 2797–2809, 2013.

MANGTANI, P. *et al.* Protection by BCG against tuberculosis: a systematic review of randomised controlled trials. **Clinical Infectious Disease**, v. 58, n. 4, p. 470-480, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5319838/>>; acessado em: 16 mar. 2020.

MANSOURI, F.; HEYDARZADEH, R. e YOUSEFI, S. The association of interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-17 single-nucleotide polymorphisms with susceptibility to tuberculosis. **APMIS**, v. 126, n. 3, p. 227-233, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apm.12810>>; acessado em: 12 jun. 2019.

MARAKALALA, M. J. *et al.* Inflammatory signaling in human Tuberculosis granulomas is spatially organized. **Natural Medicine**, v. 22, n. 5, p. 531–538, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4860068/>>; acessado em: 24 mai. 2020.

- MARCHIE, T. T. e AKHIGBE, O. T. Comparing the level of CD4 T lymphocytes, to pulmonary features of tuberculosis in hiv patients in a local hospital. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 13, n. 3, p. 254-259, 2010.
- MARIANI, F. *et al.* Macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* during HIV infection: relationships between macrophage activation and apoptosis. **Current Molecular Medicine**, v. 1, p. 209-216, 2001.
- MARÍN, N. D. *et al.* Reduced Frequency of Memory T Cells and Increased Th17 Responses in Patients with Active Tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1667–1676, 2012.
- MARTINO, M. *et al.* Immune Response to Mycobacterium tuberculosis: A Narrative Review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. 350, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2019.00350/full>>; acessado em: 24 mai. 2020.
- MBOW, M. *et al.* HIV and Tuberculosis co-infection impacts T-cell activation markers but not the numbers subset of regulatory T-cells in HIV-1 infected patients. **Afr J Lab Med**, v. 2, n. 1, 8 p., 2013.
- MEDLAR, E. M. The pathogenesis of minimal pulmonary tuberculosis; a study of 1,225 necropsies in cases of sudden and unexpected death. *American Review in Tuberculosis*, v. 58, p. 583–611, 1948. Disponível em: <<https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/art.1948.58.6.583>>; acesso em: 10 fev. 2020.
- MEHTO, S. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* and Human Immunodeficiency Virus Type 1 cooperatively modulate macrophage apoptosis via toll like receptor 2 and calcium homeostasis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-20, 2015.
- MENEZES, S. M. *et al.* A Fashi lymphoproliferative phenotype reveals non-apoptotic Fas signaling in HTLV-1-associated neuroinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 97, 2017.
- MISHRA, A. e SUROLIA, A. Mycobacterium tuberculosis: Surviving and Indulging in an Unwelcoming Host. **IUBMB Life**, v. 70, n. 9, p. 917-925, 2018. Disponível em: <<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.1882>>, acessado em: 24 mai. 2020.
- MOHAREER, K.; ASALLA, S. e BANERJEE, S. Cell death at the cross roads of host-pathogen interaction in Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v. 113, p. 99–121, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472979218301100?via%3Dihub>>, acessado em: 10 mar. 2019.
- MONGA, S. *et al.* Clinical study of extrapulmonary head and neck tuberculosis in an urban setting. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 37, p. 493-499, 2017. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/29327734>>, acessado em: 22 mai. 2020.

- MORACO, A. H. e KORNF, H. Cell Death and Autophagy in TB. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 497–511, 2014. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.00162.2017>>, acessado em: 11 jun. 2020.
- MORAIS-PAPINI *et al.* A. Systemic Immunological changes in patients with distinct clinical outcomes during Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunobiology**, v. 222, p. 1014-1024, 2017.
- NASI, M. *et al.* Novel genetic association of TNF- α -238 and PDCD1-7209 polymorphisms with long-term non-progressive HIV-1 infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, p. e845-850, 2013.
- NDHLOVU, Z. M. *et al.* Magnitude and kinetics of cd8⁺ t cell activation during hyperacute hiv infection impact viral set point. **Immunity**, v. 43, p. 1-14, 2015.
- NDISHIMYE, P. *et al.* CD4⁺ regulatory T cells and CD4⁺ activated T cells in new active and relapse tuberculosis. **Cellular and Molecular Biology**, v. 65, n. 8, p. 18-23, 2019.
- NEGASH, M. *et al.* Phenotypic and Functional Heterogeneity of Peripheral $\gamma\delta$ T Cells in Pulmonary TB and HIV Patients in Addis Ababa, Ethiopia. **BMC Infectious Disease**, v. 18, n. 1, p. 464, 2018.
- NORTH, R. J. e IZZO, A. A. Mycobacterial Virulence. Virulent Strains of Mycobacteria tuberculosis Have Faster In Vivo Doubling Times and Are Better Equipped to Resist Growth-inhibiting Functions of Macrophages in the Presence and Absence of Specific **Immunity**. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1723-1733 1993. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/177/6/1723/50441/Mycobacterial-virulence-Virulent-strains-of>>, acessado em: 28 mai. 2020.
- O’GARRA, A. *et al.* The Immune Response in Tuberculosis. **Annual Reviews in Immunology**, v. 31, p. 475–527, 2013. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>>, acessado em: 18 mar. 2020.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS. **The End TB Strategy**. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/the-end-tb-strategy>. Accessed October 2021.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS. **Global Tuberculosis Report**. 20^a Edição, 2021a, 297 p.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS, Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, s, 2016–2021, 2019b, 43 p.
- ORLANDO, V. *et al.* Human CD4 T-Cells With a Naive Phenotype Produce Multiple Cytokines During Mycobacterium Tuberculosis Infection and Correlate With Active Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1119, 2018.

ORME, I. M.; BASARABA, R. J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. **Seminars in Immunology**, v. 26, p. 601–609, 2014.

OUNI, R. *et al.* Granzyme B induced by Rv0140 antigen discriminates latently infected from active tuberculosis individuals, **Journal of Leukocytes and Biology**, v. 8, p. 1–10, 2018.

PAJUELO, D. *et al.* NAD⁺ Depletion Triggers Macrophage Necroptosis, a Cell Death Pathway Exploited by Mycobacterium tuberculosis. **Cell Reports**, v. 24, n. 2, p. 429–440, 2018. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(18\)30952-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS221124718309525%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(18)30952-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS221124718309525%3Fshowall%3Dtrue)>, acessado em: 11 jun. 2020.

PALMER, M. V. Emerging Understanding of Tuberculosis and the Granuloma by Comparative Analysis in Humans, Cattle, Zebrafish, and Nonhuman Primates. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 1, 8-10 2018; Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985817712795>>, acessado em: 24 mai. 2020.

PANDO, R. H.; OROZCO, H.; AGUILAR, D. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 57, p. 355–367, 2009.

PARANDHAMAN, D. K. e NARAYANAN, S. Cell death paradigms in the pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 31, 2014. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985817712795>>, acessado em: 08 nov. 2019.

PATEL, N. R. *et al.* HIV impairs TNF- α mediated macrophage apoptotic response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 10, p.6973-6980, 2007.

PATHAKUMARI, B.; DEVASUNDARAM, S. e RAJA, A. Altered expression of antigen-specific memory and regulatory T-cell subsets differentiate latent and active tuberculosis. **Immunology**, v. 153, p. 325–336, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.12833>>, acessado em: 09 jun. 2020.

PAUL, S.; LAOCHUMROONVORAPONG, P. e KAPLAN, G. Comparable Growth of Virulent and Avirulent Mycobacterium tuberculosis in Human Macrophages In Vitro. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p. 105-112 1996.

PERDOMO, C. *et al.* Mucosal BCG Vaccination Induces Protective Lung-Resident Memory T Cell Populations against Tuberculosis. **MBio**, v. 7, n. 6, e01686-16, 2016.

Persistent Tuberculosis Despite Continued Expression of Interferon- γ and Nitric Oxide Synthase 2. **Journal of Experimental. Medicine**, v. 192, n. 3, 2000.

PETO, H. M. *et al.* Epidemiology of Extrapulmonary Tuberculosis in the United States, 1993–2006. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1350–1357, 2009.

- PIENAR, E. *et al.* Multiscale Model of Mycobacterium tuberculosis Infection Maps Metabolite and Gene Perturbations to Granuloma Sterilization Predictions. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 5, 2016. Disponível em: <<https://iai.asm.org/content/84/5/1650>>, acesso em: 24 mai. 2020.
- PREZZEMOLO, T. *et al.* Functional signatures of human CD4 and CD8T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. 180, p. 1-13, 2014.
- PREZZEMOLO, T. *et al.* Detailed characterization of human Mycobacterium tuberculosis specific HLA-E restricted CD8⁺ T cells. *European Journal of Immunology*, v. 48, n. 2, p. 293–305, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201747184> >, acesso em: 22 mar. 2020.
- QUALLS, J. E. e MURRAY, P. J. Immunometabolism within the tuberculosis granuloma: amino acids, hypoxia, and cellular respiration. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 139–152, 2015.
- QUINTERO-MACÍAS, L. *et al.* Reduced in vivo Cytotoxicity and Increased Mycobacterial Burden Are Associated with Virulent Mycobacterium tuberculosis Strains During Lung Infection. **Immunological Investigations**, v. 41, p. 51–60, 2012.
- RAI, P. K. *et al.* A lipidated bi-epitope vaccine comprising of MHC-I and MHC-II binder peptides elicits protective CD4 T cell and CD8 T cell immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Translational Medicine*, v. 16, n. 279, 2018 Disponível em: <<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-018-1653-x>>, acesso em: 28 mar. 2020.
- RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352-66, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri3211>>, acesso em: 17 mar. 2020
- RAMOS-MARTINEZ *et al.*, 2019.
- RANJBAR, S. HIV-1 replication is differentially regulated by distinct clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**, v. 4, n.7, e6116, 2009.
- RAO, M. *et al.* Latent TB Infection (LTBI) – Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and the dynamics of the granuloma battleground. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 80, p. S58–S61, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971219300992>>, acesso em: 15 mar. 2020.
- REFAI, A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Virulent Factor ESAT-6 Drives Macrophage Differentiation Toward the Pro-inflammatory M1 Phenotype and Subsequently Switches It to the Anti-inflammatory M2 Phenotype. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 327, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00327/full>>, acesso em: 26 mai. 2020.

REYES, N. *et al.* Microarray analysis of the in vitro granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Colombia Médica**, v. 46, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4437284/>>; acessado em: 24 mai. 2020.

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

RODRIGUES, D. S. *et al.* Distribution of Naive and Memory/Effector CD4⁺ T Lymphocytes and Expression of CD38 on CD8⁺ T Lymphocytes in AIDS Patients With Tuberculosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p.161-165, 2003.

RODRIGUES, D. S. S. *et al.* Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 128, p. 149–154, 2002.

ROMERO, M. M. *et al.* Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

ROWIŃSKA-ZAKRZEWSKA, E. *et al.* What factors may influence epidemiological situation of tuberculosis in Poland and in the world? **Pneumonologia i Alergologia Polska**, v. 84, n. 2, p.126–133, 2016. Disponível em: <https://journals.viamedica.pl/pneumonologia_i_alergologia_pol/article/view/45215>; acessado em: 22 mai. 2020.

RUEDA, C. M. *et al.* Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN- γ in human latente and active tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 90, p. 346-353, 2010.

SALUSTO, F.; GEGINAT, J. e LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory t cell subsets: Function, Generation, and maintenance. **Annu. Rev. Immunol.** v. 22, p. 745–763, 2004.

SANCHES, L.; CARVALHO, A.; DUARTE, R. Who are the patients with extrapulmonary tuberculosis? **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 21, n. 2, p. 90-93, 2015.

SARATHY, J. P. e DARTOIS, V. Caseum: a Niche for *Mycobacterium tuberculosis* Drug-Tolerant Persisters, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, e00159-19, 2020. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/33/3/e00159-19>>; acessado em: 26 mai. 2020.

SARKAR, R. *et al.* Modern Lineages of *Mycobacterium tuberculosis* Exhibit Lineage-Specific Patterns of Growth and Cytokine Induction in Human Monocyte-Derived Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43170, 2012.

SAXENA, A.; DAGUR, P. K. e BIANCOTTO, A. Multiparametric Flow Cytometry Analysis of Naïve, Memory, and Effector T Cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 2032, p. 129-140, 2019.

- SCANGA, C. A. *et al.* Depletion of CD4⁺ T Cells Causes Reactivation of Murine
- SELVARAJ, P. *et al.* CD209 gene polymorphisms in South Indian HIV and HIV-TB patients. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 256-262, 2009.
- SEMPLE, P. L. *et al.* Regulatory T Cells Attenuate Mycobacterial Stasis in Alveolar and Blood-derived Macrophages from Patients with Tuberculosis. **American Journal of Respiratory Crit Care Med**, v. 187, n. 11, p. 1249–1258, 2013.
- SHAMSI, M.; ZOLFAGHARI, M. R. e FARNIA, P. Association of IFN- γ and P2X7 Receptor Gene Polymorphisms in Susceptibility to Tuberculosis Among Iranian Patients. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 63, n. 1, p. 93-101, 2016. Disponível em: <<https://akjournals.com/view/journals/030/63/1/article-p93.xml>>; acessado em: 20 mai. 2020.
- SHAO, L. *et al.* Hierarchy low CD4⁺/CD8⁺ T-cell counts and IFN- γ responses in HIV-1⁺ individuals sorrelate with active TB and/or Mtb Co-Infection. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1-12, 2016.
- SHARMA, M. *et al.* Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-c in response to Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 229–237, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/sj.icb.7100037>>, acessado em: 23 mai. 2020.
- SHEN, P. IRAK-M alters the polarity of macrophages to facilitate the survival of Mycobacterium tuberculosis. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 185.
- SILVA, D. A. A. *et al.* TNF- α blockade impairs in vitro tuberculous granuloma formation and down modulate Th1, Th17 and Treg cytokines. PLoS ONE, v. 13, n. 3, e0194430, 2018; Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194430>>, acessado em: 18 mar. 2020.
- SIMEONE, R. *et al.* Perspectives on mycobacterial vacuole-to-cytosol translocation: the importance of cytosolic access. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 1070–1077, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cmi.12622>>, acessado em: 26 mai. 2020.
- SINGH, A. *et al.* Inhibiting the Programmed Death 1 Pathway Rescues Mycobacterium tuberculosis–Specific Interferon γ –Producing T Cells From Apoptosis in Patients With Pulmonary Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, p. 603–152, 2013.
- SONNENBERG, P. *et al.* How Soon after Infection with HIV Does the Risk of Tuberculosis Start to Increase? A Retrospective Cohort Study in South African Gold Miners. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 150–158, 2005.
- SPIRA, A. *et al.* Apoptosis Genes in Human Alveolar Macrophages Infected With Virulent or Attenuated Mycobacterium Tuberculosis: A Pivotal Role for Tumor Necrosis Factor. **American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology**, v. 29, n. 5, p. 545-551, 2003. Disponível em:

<<https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1165/rcmb.2002-0310OC>>, acessado em: 14 jan. 2019.

STEIGLER, P.; VERRALL, A. J. e KIRMAN, J. R. Beyond memory T cells: mechanisms of protective immunity to tuberculosis infection. **Immunology e Cell Biology**, p. 1–9, 2019.

STERNE, J. A.; RODRIGUES, L. C. e GUEDES, I. N. Does the Efficacy of BCG Decline With Time Since Vaccination? **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 2, n. 3, pp. 200-207, 1998. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/1998/00000002/00000003/art00005;jsessionid=30lrard3gq2t3.x-ic-live-03>>; acessado em: 14 jun. 2020.

SU, H. *et al.* Recombinant Lipoprotein Rv1016c Derived from Mycobacterium tuberculosis Is a TLR-2 Ligand that Induces Macrophages Apoptosis and Inhibits MHC II Antigen Processing. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 147, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2016.00147/full>>; acessado em: 10 dez. 2019.

SUAREZ, G. V. *et al.* HIV–TB coinfection impairs CD8⁺ T-cell differentiation and function while dehydroepiandrosterone improves cytotoxic antitubercular immune responses. **European Journal of Immunology**, v. 45, p. 2529–2541, 2015.

TAHERI, M. *et al.* Association Between P2X7 Polymorphisms and Susceptibility to Tuberculosis: An Updated Meta-Analysis of Case-Control Studies. **Medicina (Kaunas)**, v. 55, n. 6, p. 298, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1010-660X/55/6/298>>; acessado em: 14 jun. 2020.

TATEOSIAN, N. L. *et al.* IL17A augments autophagy in Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes from patients with active tuberculosis in association with the severity of the disease. **Autophagy**, v. 13, n. 7, p. 1191-1204, 2017.

TEO, S. S. S. e SHINGADIA, D. BCG Vaccine. **Hot Topics in Infection and Immunity in Children II**, p. 117-134, 2005. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1007/0-387-25342-4_8>; acessado em: 14 jun. 2020;

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

TONG, H. V. *et al.* Human genetic factors in tuberculosis: an update. **Tropical Medicine and International Health**, v. 22, n. 9, p. 1063–1071, 2017.

TRAM, T. T. B. *et al.* Virulence of Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates Is Associated With Sputum Pre-treatment Bacterial Load, Lineage, Survival in Macrophages, and Cytokine Response, **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 417, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00417/full>>; acessado em: 12 jun. 2020.

TSAI, M. C. *et al.* Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension, **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 218–232, 2006.

UFIMTSEVA, E. *et al.* Mycobacterium tuberculosis with different virulence reside within intact phagosomes and inhibit phagolysosomal biogenesis in alveolar macrophages of patients with pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 114, p. 77-90, 2019; Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979218304645?casa_token=DJAoEfiEVLcAAAAA:YAAkzCF6xYzB3onr9_UFLGsDopy4WO73V88105ez-rUS0PWZy0fbHsZeObT37p9EZ8yEJUHC-M>; acessado em: 26 mai. 2020.

UPADHYAY, S.; MITTAL, E. e PHILIPS, A. Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. **Pathogens and Disease**, v. 76, 2018.

VAN DEN BROEK, T.; BORGHANS, J. A. e WIJK, F. V. The full spectrum of human naive T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 363-373, 2018.

VARAHRAM, M. *et al.* Association of *Mycobacterium Tuberculosis* Lineages with IFN- γ and TNF- α Gene Polymorphisms among Pulmonary Tuberculosis Patient. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, e2014015, 2014.

VIA, L. E. *et al.* Tuberculous Granulomas Are Hypoxic in Guinea Pigs, Rabbits, and Nonhuman Primates. **Infection And Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2333–2340, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423064/>>; acessado em: 25 mai. 2020.

VOGELZANG, A. *et al.* Central Memory CD4⁺ T Cells Are Responsible for the Recombinant Bacillus Calmette-Guérin Δ ureC::hly Vaccine's Superior Protection Against Tuberculosis. **The Journal of Infectious Disease**, 2014

VYAS, S. P. e GASWAMI, R. Striking the right immunological balance prevents progression of tuberculosis. **Inflammation Research**, v. 66, n. 12, p. 1031–1056, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00011-017-1081-z>>; acessado em: 24. Mai. 2020.

WANG, L. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Lipoprotein MPT83 Induces Apoptosis of Infected Macrophages by Activating the TLR2/p38/COX-2 Signaling Pathway, **The Journal of Immunology**, v. 198, p. 4772-4780, 2017. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/198/12/4772>>; acessado em: 13 nov. 2019.

WANG, P. *et al.* Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 568, 2010. Disponível em: <<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-11-568>>; acessado em: 15 mai. 2020.

WON, E. J. *et al.*, Biomarkers for discrimination between latent tuberculosis infection and active Q8 tuberculosis disease. **J Infect**, P. 1-13, 2017.

WONG, E. A. *et al.* Low Levels of T Cell Exhaustion in Tuberculous Lung Granulomas. **Infection and Immunity**, v. 86, e 00426-18, 2018.

- WONG, E. A. *et al.* Low Levels of T Cell Exhaustion in Tuberculous Lung Granulomas. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 9, e00426-18, 2019. Disponível em: <<https://iaa.asm.org/content/86/9/e00426-18>>; acessado em: 20 mai. 2020.
- WOODWORTH, J. S. M. e BEHAR, S. M. Mycobacterium tuberculosis specific CD8⁺ T cells and their role in immunity. *Critical Reviews Immunology*, v. 26, n. 4, p. 317–352, 2006. Disponível em: <<http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,225ec1d93ad9822f,2fc7e4607b0573ff.html>>; acessado em: 25 mai. 2020.
- WYNDHAM-THOMAS, C. *et al.* Immune Activation by Mycobacterium tuberculosis in HIV-Infected and -Uninfected Subjects. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 74, n. 1, 2017.
- XU, G. *et al.* Insights into battles between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages. **Protein & Cell**, v. 5, n. 10, p. 728-736, 2014.
- YANG, J. D. *et al.* Mycobacterium tuberculosis-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells differ in their capacity to recognize infected macrophages. **PLoS Pathogens**, v.14, n. 5, e1007060, 2018.
- YAO, S. *et al.* CD4⁺ T cells are required to contain early extrathoracic TB dissemination and sustain multi-effector functions of CD8⁺ T and CD3 – lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 192, n. 5, p. 2120–2132, 2014.
- YIN, Y. *et al.* The CD4⁺/CD8⁺ Ratio in Pulmonary Tuberculosis: Systematic and Meta-Analysis Article. **Iran J Public Health**, v. 44, n. 2, p.185-193, 2015.
- ZHANG L.H. AK5, a novel prognosis marker, inhibits apoptosis and promotes autophagy as well as proliferation in human gastric cancer. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 23, p. 9900-9906, 2019.
- ZHANG, F. D. *et al.* Diagnosis of latent tuberculosis by ELISPOT assay and tuberculin skin test. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 46, n. 3, p. 150-153, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X16000603?via%3Dihub/>>; acessado em: 22 mai. 2020.
- ZHANG, M. *et al.* Growth of Virulent and Avirulent Mycobacterium tuberculosis Strains in Human Macrophages. **Infection And Immunity**, v. 66, n. 2, p. 794–799, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC107972/>>; acessado em: 28 mar. 2020.
- ZHAO, J.; WEN, C. e LI, M. Association Analysis of Interleukin-17 Gene Polymorphisms with the Risk Susceptibility to Tuberculosis. **Lung**, v. 194, n. 3, p. 459-467, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00408-016-9860-9>>; acessado em: 12 jun. 2020.
- ZHOU, Y. *et al.* Virulent Mycobacterium bovis Beijing Strain Activates the NLRP7 Inflammasome in THP-1 Macrophages, **PLoS One**, v. 11, n. 4, e0152853, 2016. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0152853>>;
acessado em: 19 nov. 2019.