



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**LUCIANA POLACO COVRE**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE RECEPTORES TIPO *TOLL* 2 e 4 NA  
RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS SADIOS, REATIVOS OU NÃO AO  
TESTE TUBERCULÍNICO, FRENTE AO DESAFIO *in vitro* COM  
*Mycobacterium tuberculosis***

**Vitória  
2013**

LUCIANA POLACO COVRE

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE RECEPTORES TIPO *TOLL* 2 e 4 NA  
RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS SADIOS, REATIVOS OU NÃO AO  
TESTE TUBERCULÍNICO, FRENTE AO DESAFIO *in vitro* COM  
*Mycobacterium tuberculosis***

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

Vitória  
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

C873a Covre, Luciana Polaco, 1988-  
Avaliação do papel de receptores tipo toll 2 e 4 na resposta imune de indivíduos sadios, reativos ou não ao teste tuberculínico, frente ao desafio *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis* / Luciana Polaco Covre. – 2013.  
95 f. : il.

Orientador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues.

Coorientador: Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.

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

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Tuberculose – Prevenção. 3. Teste tuberculínico. 4. Células T. 5. Imunidade. I. Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Gomes, Daniel Cláudio de Oliveira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda LUCIANA POLACO COVRE apresentou a dissertação intitulada “**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE RECEPTORES TIPO TOLL 2 e 4 NA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS, SADIOS REATIVOS OU NÃO AO TESTE TUBERCULÍNICO, FRENTE AO DESAFIO *in vitro* COM *Mycobacterium tuberculosis***” em sessão pública, no dia 29 de agosto de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu () **aprovar** (  ) **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica LUCIANA POLACO COVRE a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 29 de agosto de 2013

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck  
(Membro Externo)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
(Membro Interno)

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues  
(Orientador)

*Dedico esta dissertação aos meus pais  
Carlos Augusto e Lucimar. A vocês,  
minha imensa gratidão e amor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço

A Deus nosso pai, pelas oportunidades de crescimento moral e intelectual.

A Jesus nosso mestre, por ser exemplo e modelo a seguir como ser humano.

Ao meu anjo guardião pela proteção e inspirações para o bem.

A minha família pelos momentos de extrema alegria e apoio. Aos meus pais Lucimar e Augusto, pelo amor e exemplo de honestidade e integridade. Minhas irmãs e cunhados pelo incentivo e carinho. Meu marido por sua ajuda, compreensão e paciência durante os momentos de inquietação e cansaço, pela maneira divertida e carinhosa que são os dias ao seu lado e por poder ter seu apoio científico e emocional ao mesmo tempo.

A meus amigos, pela cumplicidade e por todos os momentos de descontração.

A meu orientador Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo incentivo e compreensão durante esses anos e principalmente pela confiança depositada durante minha orientação.

A meu co-orientador Dr. Daniel Claudio de Oliveira Gomes pela disponibilidade e presença durante todo o desenvolvimento dessa dissertação.

A todos do laboratório de imunologia celular e molecular, pela boa e divertida convivência, tornando o ambiente de trabalho prazeroso e agradável; Em especial, ao Lorenzo, Flávia e Priscila pela ajuda durante os experimentos, Naira pela revisão e ajuda com a correção desta dissertação e Janine, Marcelle e Nataly pela ajuda com as referências.

A querida Lau, pelo excelente trabalho e cuidado com todos os materiais utilizados em nosso estudo.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas pelo conhecimento, em especial aos professores Angélica Espinosa Miranda pela ajuda com os testes estatísticos; Elenice Moreira Lemos, por sempre estar disposta a ajudar,

pelas discussões científicas e pelo apoio; Moisés Palaci pela disponibilidade e esclarecimento das dúvidas e Fausto Edmundo Lima Pereira por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho, pelo exemplo profissional e pela oportunidade de convivência e conversas, que acrescentam em muito na minha formação científica e pessoal.

Ao professor Ricardo Pinto Schuenck pela disponibilidade de participar da banca avaliadora e enriquecer com sugestões e ideias esse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas, em especial à Wayna Sad Lyrio Stringari, pela ajuda e esclarecimentos administrativos.

A todos do laboratório de Microbacteriologia, em especial à Solange Alves Vinhas e Tatiana Resende Có pelos ensinamentos e esclarecimentos.

Ao programa CAPES/REUNI pela bolsa concedida que permitiu minha dedicação total à pesquisa durante o período de vigência da bolsa.

A todos os participantes que consentiram em participar do estudo e permitiram a realização dessa dissertação.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente auxiliaram e torceram pelo desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada!

“... A incerteza traz inspiração.”

(Fernando Anitelli)



## RESUMO

Acredita-se que indivíduos PPD+ representam um dos maiores reservatórios de transmissão da tuberculose, pois podem sofrer uma reativação da tuberculose latente e transmitir silenciosamente o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) para seus contactantes. Em relação aos casos de tuberculose ativa existentes, sabe-se que a maioria é devido à reativação da infecção latente. Portanto a latência ainda é um grande obstáculo para alcançar o controle da tuberculose. A capacidade de controlar a infecção pelo Mtb está correlacionada com as funções imunológicas do hospedeiro. Os receptores Tipo *Toll*, principalmente TLR2 e TLR4, podem exercer participação direta a respeito dessa função imune, visto que possuem capacidade de iniciarem e direcionarem tanto a resposta inata quanto a adaptativa. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel de receptores do tipo *Toll* 2 e 4 na resposta imune de indivíduos sadios reativos ou não ao teste tuberculínico (PPD+ e PPD-) frente ao desafio *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*. Para isso, foram arrolados 13 indivíduos PPD+ e 11 indivíduos PPD-, nos quais avaliamos: 1) a frequência de células T reguladoras, 2) a atividade microbicida, e o 3) perfil de citocinas e óxido nítrico, após a infecção com o Mtb com ou sem o bloqueio dos receptores TLR2 e TLR4. Observamos que indivíduos PPD+ apresentaram maior frequência de células T reguladoras e carga bacilar que o grupo PPD- e que os receptores TLR2 e TLR4 possuem papel distinto na ativação da resposta imune. O bloqueio do receptor TLR2 reduziu a frequência de células T reguladoras e a capacidade microbicida do grupo PPD+. Por outro lado o bloqueio do receptor TLR4 aumentou a capacidade microbicida dos grupos PPD+ e PPD-, o que pode estar associado à redução na produção da citocina IL10. Dessa forma, nossos dados sugerem que a pré-exposição ao Mtb e/ou micobactérias ambientais, apesar de levar a uma memória imunológica nos indivíduos PPD+, não influencia na capacidade de eliminação do patógeno por esse grupo. Diversos mecanismos podem estar associados a essa dificuldade na eliminação do Mtb sendo a imunorregulação provocada pelo aumento de células T reguladoras um desses mecanismos. Além disso, observamos que os receptores TLR 2 e TLR4 possuem capacidade de modular a resposta imune contra o Mtb e podem ser futuros alvos para tratamentos anti-TB e quimioprofilaxia da TB latente.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose latente, *Purified Protein Derivative*, PPD, células T reguladoras, receptores tipo *Toll*.

## ABSTRACT

It is believed that TST+ individuals represent a major reservoir of tuberculosis transmission, reason they can reactivate the latent TB bacilli and silently transmit *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) to other contacts. Related to active tuberculosis cases, the majority is caused by latent infection reactivation, thus the latency is still a major obstacle to achieving tuberculosis control. Toll-like receptors (TLR) particularly TLR2 and TLR4 can participate in the regulation of the immune system since they have the ability to drive the innate and adaptive immune response. In this study we aimed to evaluate the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the immune response from tuberculin skin test positive (TST +) and tuberculin skin test negative (TST -) healthy individuals upon challenge *in vitro* with *Mycobacterium tuberculosis*. Twenty-four healthy volunteers were invited to participate in our study, 13 TST + and 11 TST - where were evaluated: 1) the frequency of regulatory T cells; 2) the microbicidal activity and 3) cytokines profile and nitric oxide production after Mtb infection with or without TLR2 and TLR4 blocking. TST + individuals showed higher frequency of regulatory T cells and bacterial load when compared to TST- group. TLR2 receptor blocking reduced the Tregs frequency and microbicidal capacity in the TST + individuals, different from observed in both TST + and TST - after TLR4 blocking, which showed an increased microbicidal activity and decreased IL10 production. Our data suggest that Mtb pre-exposure and / or environmental mycobacteria although lead to immunological memory in TST + individuals do not affect the ability of pathogen clearance. Moreover, we observed that TLR 2 and TLR4 receptors are capable of modulating the immune response against Mtb and may be targets for future anti-TB treatments and chemoprophylaxis of latent TB.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, latent tuberculosis, Purified Protein Derivative, TST, Regulatory T cells, Toll-like Receptors.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema utilizado para a realização da diluição seriada. ....30
- Figura 2: Representação do processo de análise das amostras estudadas por citometria de fluxo através do programa FLOWJO 7.6.5. A) Seleção da população de linfócitos, através dos parâmetros de granulosidade *versus* tamanho. B) Representação do controle isotópico, com baixa presença de ligações inespecíficas. C) Seleção de células CD4<sup>++</sup>, por meio dos parâmetros tamanho *versus* fluorescência relativa detectada por FL3. D) Quantificação dos eventos de células T reguladoras mediante a emissão da fluorescência relativa detectada em FL2 *versus* FL1. ....35
- Figura 3: Análise fenotípica por citometria de fluxo da frequência de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) em amostras de cultura de sangue total dos grupos PPD- e PPD+ incubadas por 4 e 72 horas com a cepa H37Rv. Os resultados estão expressos em média do percentual de células e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ . ....41
- Figura 4: Análise fenotípica por citometria de fluxo da frequência de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) em amostras de cultura de sangue total entre os grupos PPD- e PPD+ incubadas por 4 e 72 horas com a cepa H37Rv. Os resultados estão expressos em média do percentual de células e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ . ....42
- Figura 5: Capacidade microbicida em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD-. Os resultados estão expressos em média da concentração bacilar (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ . ....44
- Figura 6: Capacidade microbicida em culturas de sangue total entre indivíduos PPD+ e PPD-. Os resultados estão expressos em média da concentração bacilar (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ . ....45
- Figura 7: Gráfico de dispersão correspondente aos valores da % de células T reguladoras e do teste tuberculínico (PPD). ....47
- Figura 8: Gráfico de dispersão correspondente aos valores das unidades formadoras de colônias e do teste tuberculínico (PPD). ....47

- Figura 9: Nível de Óxido nítrico em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração de NO ( $\mu\text{M}$ ) e desvio padrão para cada grupo analisado.....49
- Figura 10: Nível de Interferon gama em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. ....52
- Figura 11: Nível de Interleucina 4 em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. ....54
- Figura 12: Nível de Fator de transformação do crescimento beta em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.....56
- Figura 13: Nível de Interleucina 10 em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. ....58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície. ....	33
Tabela 2: Dados demográficos dos indivíduos clinicamente saudáveis reativos ou não ao PPD ( <i>purified protein derivative</i> ). ....	40

## LISTA DE SIGLAS

A.C. – Antes de cristo

AD - *Assay Diluent*

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

APC - Células apresentadoras de antígenos

BCG - *Bacilo Calmette Guérin*

CCI - Controle de crescimento do inóculo

CD - *Cluster of differentiation*

CTLA-4 - *Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4*

DC - Células dendríticas

DO - Densidade óptica

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FL - Fluorescência

FOXP3 - *Forkhead transcription factor 3*

FSC - *Foward Scatter*

GATA-3 - *Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3*

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - Ácido Fosfórico

HCl - *Ácido clorídrico*

HIV - *Human immunodeficiency virus*

HRP - Enzima Avidina-Horseradish peroxidase

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes

i Treg – Células T reguladoras induzidas

IFN – *Interferon*

IGRAs - *Interferon-Gamma Release Assays*

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

iNOS - *Inducible Nitric Oxide Synthase*

IRFS - *IFN regulatory factors*

LM – Lipomanana

LPS - Lipopolissacarídeo

LTBI - Infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*

LRR - *leucine-rich repeat*

ManLAM - Lipoarabinomanana encapsulada com manose

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

MOI - *multiplicity of infection*

MS - Ministério da Saúde

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

MΦ - Macrófagos

NaOH - Hidróxido de sódio

NF-κB - *Factor Nuclear Kappa B*

NK – Células *Natural Killers*

NO - Óxido nítrico

PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

CMSP – Células mononucleares sangue periférico

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PE - *Phycoeyitrin*

PE-Cy5 - *Phycoerythrin and a cyanine dye*

PPD - *Purified Protein Derivative*

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SSC - *Side Scatter*

SVS - Secretária de Vigilância em Saúde

TB – Tuberculose

T-bet - *T-box transcription factor*

TGF - *Transforming growth factor*

Th – Célula T *helper*

T1R - *Domain Containing Adaptor Protein*

TLR - *Toll-like receptor*

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF - *Tumor Necrosis Factor*

Treg – Células T reguladoras

TS - *Top Standards*

WBKA - *Whole Blood Killing Assay*

WHO/OMS - Organização Mundial de Saúde

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>3.</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>27</b>
3.1	Modelo do estudo	28
3.2	População do estudo	28
3.3	Coleta e conservação das amostras	29
3.4	Seleção e preparo do isolado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
3.5	Quantificação da concentração de infecção - Cepa ATCC 27294 (H37Rv)	30
3.6	Ensaio da atividade dos receptores tipo Toll	31
3.6.1	Preparo do sangue - Modulação do sinal de TLR2 e TLR4	31
3.6.2	Cultura de Sangue total	<b>Error! Bookm:</b>
3.6.3	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	32
3.6.4	Avaliação da Atividade Microbicida ( <i>Whole Blood Killing Assay</i> )	35
3.6.5	Dosagem de NO	36
3.6.6	Deteção e quantificação de citocinas - Ensaio Imunoenzimático:	36
3.7	Análise Estatística	38
3.8	Considerações éticas	38
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>39</b>
4.1.	Caracterização dos indivíduos estudados	40
4.2.	Frequência de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) nas culturas de sangue total infectadas com <i>M. Tuberculosis</i> (cepa H37Rv).	40
4.3.	Capacidade microbicida dos indivíduos PPD + e PPD- em culturas de sangue total.	43
4.4.	Análise de correlação entre valor do PPD, frequência de células T reguladoras e capacidade microbicida.	46



4.5. Dosagem da produção de óxido nítrico (NO) em culturas de sangue total infectadas com isolados de <i>M. tuberculosis</i>	48
4.6. Perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de sangue total infectadas com os isolados de <i>M. tuberculosis</i> .	50
<b>5. Discussão</b>	<b>59</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>72</b>
<b>7. Referências</b>	<b>74</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>91</b>

# **1. Introdução**

A tuberculose (TB) tem acompanhado a humanidade ao longo de sua história, como comprovado pelas evidências encontradas em múmias egípcias datadas de 3.000 a 2.400 A.C. (ZINK A & HAAS C, 2001). Causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), micobactéria descrita por Robert Koch em 1882 (KOCH R, 1882, 1932 apud DANIEL TM, 2006); KAUFMANN SHE & WINAU F, 2005), a doença permanece como um grave problema de saúde pública, sendo atualmente classificada como a segunda principal causa de morte provocada por doenças infecciosas em todo mundo (WHO, 2012).

O agente etiológico Mtb, como as demais micobactérias, é classificado como bacilo álcool-ácido resistente, pois quando corado com carbol-fucsina não pode ser descorado com ácido ou álcool. Este fenômeno ocorre devido aos componentes da parede celular do bacilo, os quais contribuem para a resistência da micobactéria a estresses ambientais, como o ressecamento e o calor, bem como a medicamentos (TORTORA et al, 2000). Alguns constituintes da parede celular são os ácidos micólicos, arabinogalactanas, peptídeoglicano, glicopeptídeos, como a lipoarabinomanana (LAM), entre outros. Esses componentes do bacilo podem estar envolvidos na virulência das diferentes espécies de micobactérias e na capacidade dessas em induzir diferentes respostas imunológicas no hospedeiro infectado (ARAUJO, 2008).

Acredita-se que ao longo dos séculos, o bacilo Mtb possa ter levado a óbito mais pessoas do que qualquer outro agente microbiano conhecido (DANIEL TM, 2006). Diante disso, foram registrados mundialmente somente no ano de 2011, cerca de nove milhões de novos casos de tuberculose e 1,4 milhões de morte pela doença (WHO, 2012). No Brasil em 2012, foram notificados 70.047 novos casos, correspondentes a uma incidência de 36,1/100.000 habitantes. Esses dados colocam o país, na 17ª posição em relação ao número de casos de tuberculose quando comparado com os demais países (SINAN –MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Apesar da existência de uma tendência para a diminuição dos indicadores da doença, a facilidade do contágio e transmissão, a presença de coinfeções e a existência de cepas resistentes às drogas antituberculinicas, mantém o controle e erradicação dessa infecção como um grande desafio.

A transmissão e infecção da TB ocorrem através da inalação do bacilo contido em gotículas expelidas durante a tosse, espirro ou fala de indivíduos com a doença clinicamente ativa (DOHERTY TM & ANDERSEN P, 2005), seguida da fagocitose dos bacilos inalados pelos macrófagos alveolares e demais células como neutrófilos, monócitos e células dendríticas (KANG DD *et al.*, 2011; WOLF AJ *et al.*, 2007). A

fagocitose representa a ativação dos primeiros mecanismos de defesa da imunidade inata mediada principalmente pela produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, da acidificação do fagossoma e fusão com os lisossoma expondo as bactérias para ação de hidrolases, proteases, superóxido dismutase e lisozimas presentes no vacúolo fagocítico (RUSSEL DG *et al.*, 2009).

Estudos revelam que apesar de contínuas exposições ao Mtb, como ocorrem com profissionais de saúde e contatos domiciliares, alguns indivíduos não apresentam memória imunológica contra o patógeno (MORRISON J *et al.*, 2008; PAI M *et al.*, 2006). Estes indivíduos provavelmente eliminam a bactéria devido a uma elevada expressão da imunidade inata, tornando qualquer reação imunológica adaptativa desnecessária (BRIGHENTI S & LERM M, 2012). Um provável mecanismo por esse fenômeno vem da observação de que os contatos domiciliares saudáveis de pacientes com TB, produzem quantidades elevadas de óxido nítrico (NO) (IDH J *et al.*, 2008) o que poderia, em tese, erradicar a infecção.

Portanto, a característica patogênica da cepa inalada, o microambiente inflamatório pulmonar e a capacidade microbicida intrínseca dos macrófagos alveolares (KAUFMANN SHE, 2001) interferem na capacidade do bacilo para o escape da destruição intracelular inicial, permitindo sua sobrevivência e proliferação logarítmica no interior das células fagocitárias (CREVEL VR *et al.*, 2002). Essas células posteriormente podem sofrer ruptura, levando a disseminação do bacilo e favorecimento da infecção de novas células. Dessa forma, com a progressão da infecção, macrófagos e células dendríticas infectadas, apresentam antígenos aos linfócitos T e B, promovendo o desenvolvimento de uma resposta antígeno-específica, característica da imunidade adaptativa (KLEINNIJENHUIS J *et al.*, 2011).

A interação entre imunidade inata e adaptativa e o adequado estabelecimento da resposta adaptativa garante o controle imunológico da infecção, sendo crucial para manter a latência da TB, a qual é caracterizada pela ausência de sintomas clínicos e por uma resposta antígeno específica contra o Mtb. A TB latente (LTBI) é diagnosticada através da positividade ao ensaio de produção de IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma release assay, IGRA) ou ao teste tuberculínico, sendo esse, o mais utilizado no Brasil. O teste tuberculínico avalia a presença de linfócitos T de memória por meio da reação de hipersensibilidade tardia a um conjunto de antígenos purificados do complexo Mtb, conhecido como PPD (derivado protéico purificado) (MENZIES, 1999).

Sabe-se que linfócitos  $\gamma\delta$ , TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> são cruciais para a manutenção da latência e na prevenção da progressão da TB latente para doença ativa (SRIDHAR S *et al.*, 2011). Nesse quadro, os fatores intrínsecos do patógeno e do hospedeiro, tais como carga bacilar, fator de virulência, estado imunológico e características genéticas do indivíduo, são determinantes na susceptibilidade ou resistência à tuberculose, visto que, após o contágio apenas 10% - 30% dos indivíduos desenvolvem a doença (GARG A *et al.*, 2008; DANNENBERG AM, 1993) enquanto os demais desenvolvem a forma latente. No entanto, seja por declínio da imunocompetência dos hospedeiros latentes por imunossupressão, coinfeção pelo HIV, pelo uso de esteroides ou de terapia anti-TNF, desnutrição, tabagismo, alcoolismo, diabetes, insuficiência renal dentre outros; pode ocorrer a reativação do bacilo contido em granulomas e o desenvolvimento da doença nos hospedeiros com a infecção latente (GIDEON HP & FLYNN JL, 2011).

Durante a ação da resposta imune contra o Mtb um atraso no estabelecimento da imunidade adaptativa é frequentemente observado, a qual emerge aproximadamente 42 dias pós-infecção (WALLGREN A, 1948; POULSEN A, 1950). Esse atraso está relacionado com as diversas formas de evasão do patógeno e diretamente associado a um atraso na ativação de células T CD4<sup>+</sup> (WOLF AJ *et al.*, 2008). O surgimento da pandemia do HIV contribuiu para uma melhor compreensão da importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> para a proteção contra a TB, uma vez que a diminuição do número e perda da função dessas células, normalmente observada duramente à infecção pelo HIV/AIDS, resulta na progressão da infecção primária pelo Mtb, além de aumentar o risco de reativação da doença latente (HOPEWELL PC, 1992). Os subtipos das células CD4<sup>+</sup> auxiliares (Células T helpers, Th) Th1, Th2 e Th17, desempenham papéis diferentes durante a resposta imune contra o bacilo. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> com fenótipo Th1 expressam um fator de transcrição denominado *T-box transcription factor* (T-bet) (LU Y *et al.*, 2011; SZABO SJ *et al.*, 2000). Células Th1 são essenciais no estabelecimento e manutenção de uma resposta imune eficaz contra o Mtb através da produção e secreção de citocinas como Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), Interleucina-2 (IL-2) e IL-12. Essas citocinas ativam macrófagos e neutrófilos capazes de inibir o crescimento bacilar, induzem a produção de óxido nítrico (NO), além de ativar a produção de anticorpos pelas células B, aumentando a opsonização do bacilo (MORTAZ E *et al.*, 2012). Já as células Th2, caracterizadas pelo fator de transcrição GATA-3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3)

e pela produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (COFFMAN RL & ROMAGNANI S, 1999), são associadas à progressão da doença, inibindo mecanismos de eliminação do bacilo mediado por autofagia, bem como a ativação de macrófagos e proliferação de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$ . (HARRIS J *et al.*, 2007). A presença de IFN- $\gamma$  inibe a ativação de células Th2. Estudos relatam que defeitos na geração de células Th1 produtoras dessa citocina, aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento da infecção micobacteriana (SUZUKI Y *et al.*, 1989; SIELING PA & MODLIN RL, 1994).

A presença de células produtoras de IL-17 (Th17), diferenciadas na presença de IL-6, TGF- $\beta$ , IL1- $\beta$  e IL23 (LOUTEN J *et al.*, 2009), tem sido relacionada com a resistência do hospedeiro a infecção por Mtb (KAUFMANN SHE *et al.*, 1996). Quando ativadas, células Th17 promovem a secreção de IL-17, IL-21, IL-22 e IL-6, citocinas associadas com processos inflamatórios às quais agem induzindo o fluxo de neutrófilos e macrófagos para o pulmão (STARK MA *et al.*, 2005; SERGEJEVA S *et al.*, 2005).

Dentre as células T CD4, encontramos ainda células T reguladoras (Treg), as quais exercem um importante papel na regulação da resposta imune e da indução da tolerância imunológica. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg são encontradas no timo e no sangue periférico tanto de camundongos quanto de seres humanos (SAKAGUCHI S & SAKAGUCHI N, 2005). Treg são conhecidas por modular diretamente respostas imunes exacerbadas através de mecanismos de supressão, como por exemplo, interação por CTLA-4 e modulação negativa de células apresentadoras de antígeno (APC) com diminuição da expressão de moléculas coestimuladoras e MHC, além da secreção ou expressão membranar de citocinas reguladoras, sendo o TGF- $\beta$  (*Fator de transformação do crescimento beta*) a mais bem descrita (SHEVACK *et al.*, 2002; MCHUGH *et al.*, 2002).

No que se refere à TB, uma expansão significativa da população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> é observada em pacientes com doença pulmonar ativa quando comparados a indivíduos saudáveis (RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006; GUYOT-REVOL *et al.*, 2006). O aumento na frequência de Tregs em pacientes com TB está associado a uma diminuição na produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) quando expostas *in vitro* ao bacilo. A depleção de Tregs nesse ambiente restabelece a produção de IFN- $\gamma$ , a qual atinge níveis semelhantes àqueles observados entre indivíduos saudáveis (RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006). A expansão na frequência de células T reguladoras em culturas *in vitro* através da exposição a antígenos micobacterianos também foi demonstrada em indivíduos portadores de infecção latente,

mas não entre indivíduos saudáveis. Uma possível explicação para a indução desse fenótipo regulador pode ser devido à necessidade de controlar uma intensa resposta inflamatória, evitando assim danos teciduais durante a TB latente (HOUGARDY JM *et al.*, 2007). No entanto, apesar desse mecanismo mostrar-se benéfico para infecções agudas, ele torna-se um problema em infecções crônicas, onde há persistência do patógeno (KURSAR M *et al.*, 2007).

Recentemente, nosso grupo demonstrou um aumento na frequência de células T reguladoras *in vitro* em indivíduos saudáveis reativos ao teste tuberculínico (PPD+), após estímulo com diferentes cepas de Mtb sensíveis e resistentes a drogas. Paralelo ao aumento na frequência de Tregs foi observado uma redução na atividade microbicida dos macrófagos quando comparados com indivíduos PPD-. Após a depleção das células Tregs, a atividade microbicida no grupo PPD+ foi restabelecida ao nível encontrado no grupo controle (PPD-) (CAMPANA MCF 2010, manuscrito em preparação; STRINGARI LL, 2012 – manuscrito em preparação). Herzmann e colaboradores evidenciaram um aumento na frequência de células Treg em amostras de lavado broncoalveolar de indivíduos positivos para o ensaio de produção de IFN- $\gamma$  (IGRA+) quando comparados a indivíduos IGRA-. Estes autores propuseram a avaliação de células T reguladoras, como possível marcador para a progressão da doença ativa e para acompanhamento do tratamento (HERZMANN C *et al.*, 2012). Percebe-se assim, que existem diferentes formas de respostas celulares contra o Mtb, as quais podem favorecer tanto a progressão quanto a resolução da doença. Os mecanismos responsáveis por essa diversidade variam e estão sujeitos à presença de citocinas no meio durante a estimulação antigênica, afinidade ao antígeno e a presença de moléculas/receptores coestimuladores.

A participação de receptores que reconhecem sinais de perigo e moléculas derivadas dos patógenos, denominadas PAMPS, (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), tal como receptores da família TLR (*Toll-like receptors*), são conhecidos por sua capacidade de iniciarem e direcionarem a resposta inata, ficando também cada vez mais nítida sua participação direta e indireta na promoção da resposta imune específica, especialmente através das funções de células T moduladas direta ou indiretamente por esses receptores (KAPSENBERG ML, 2003).

TLRs são glicoproteínas de membrana formadas por um domínio extracelular LRR (*leucine-rich repeat*), responsáveis pelo reconhecimento de ligantes antigênicos e um por um domínio trans-membranar, TIR (*Toll/IL (interleukin)-1 receptor*) homólogo ao receptor citoplasmático de IL-1 (IL-1R). Esse receptor interage com adaptadores da via

de sinalização, ativa MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) e fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) e IRFS (*IFN regulatory factors*), induzindo a produção de citocinas inflamatórias e de IFN tipo I. (DOHERTY TM & ARDITI M, 2004; AKIRA S & TAKEDA K, 2004). Os membros dessa família são expressos de forma diferenciada em distintos tipos celulares como células B, naturais killers, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, sendo encontrados tanto na superfície da célula (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) quanto no interior de endossomas (TLR 3, TLR7, TLR8 e TLR9) (KUMAR *et al.*, 2009).

A modulação da resposta imune através da sinalização mediada por TLRs é de grande importância para o estabelecimento de uma interação eficiente entre a imunidade inata e adaptativa, e da defesa do hospedeiro contra a infecção pelo Mtb (SAIGA H *et al.*, 2011). TLR2, TLR4, TLR9 e possivelmente TLR8, tem sido descrito como importantes no reconhecimento do Mtb por células do sistema imune (DAVILA S *et al.*, 2008; TAPPING RI & TOBIAS PS, 2003). Estudos demonstram a participação do TLR2 no reconhecimento de lipopeptídeos micobacterianos, incluindo lipoarabinomanana, fosfatidil inositol, lipoproteínas e lipídeos (MEANS TK *et al.*, 2001; JONES WB *et al.*, 2001), e revelam seu importante papel na iniciação da imunidade inata e na estimulação da produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (BAFICA A *et al.*, 2005; UNDERHILL DM *et al.*, 1999). Modelos experimentais *in vivo* evidenciam uma maior suscetibilidade de camundongos depletados (*knockouts*) para TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) à infecção pelo Mtb e relatam ainda dificuldades na formação do granuloma e no controle da infecção crônica por animais TLR2<sup>-/-</sup>, quando comparados com animais com o fenótipo selvagem para esse TLR (DRENNAN MB *et al.*, 2004). Estudos conduzidos *in vitro* demonstraram a participação de TLR9 na regulação da função de neutrófilos (MORTAZ E *et al.*, 2012) e sua cooperação com TLR2 na modulação da resposta de células dendríticas e macrófagos, induzindo a produção de IL-12 (BAFICA A *et al.*, 2005; POMPEI L *et al.*, 2007). Estudos em seres humanos demonstraram que o TLR2 media a ativação de macrófagos e regula a expressão do receptor de vitamina D e os genes da enzima D-1-hidroxilase, levando à indução do péptido antimicrobiano catelicidina e a morte intracelular do Mtb. Liu e colaboradores, observaram que a ativação de TLR2/1 desencadeia a produção de IL-37, dependente de vitamina D, e aumenta a morte dos bacilos em macrófagos humanos (LIU PT *et al.*, 2006).

Por outro lado a atribuição do receptor TLR4 no reconhecimento do Mtb em camundongos permanece contraditória (KLEINNIJENHUIS J *et al.*, 2011). Sabemos que



TLR4 pode ser ativado pela proteína de choque térmico 60/65 (HSP60/65) (BULUT Y *et al.*, 2005; OHASHI K *et al.*, 2000), a qual é secretada por uma variedade de espécies de micobactérias. Alguns autores demonstraram que a susceptibilidade à infecção em camundongos selvagens e TLR4 deficientes é semelhante (REILLING N *et al.*, 2002). Enquanto outros defendem a hipótese que sinais desse receptor são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta protetora durante a infecção crônica pelo Mtb. (ABEL B *et al.*, 2002). A ativação de TLR é relevante para regular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IL-6, essenciais no recrutamento de células imunes para o sítio de infecção e, por conseguinte o controle da infecção pelo Mtb (YAMADA H *et al.*, 2000; FREMOND CM *et al.*, 2004). Desse modo, polimorfismos genéticos e mutações no TLR ou em proteínas da via de sinalização, podem afetar o desempenho da resposta inata do hospedeiro contra o Mtb, favorecendo o estabelecimento da infecção e a progressão da doença (CREVEL VR *et al.*, 2002). Essa hipótese tem sido confirmada através de vários estudos que demonstraram a existência de uma associação entre polimorfismos nos genes do TLR2 e do TLR4 e a susceptibilidade à infecção pelo MTB (CAWS M *et al.*, 2008; ZAKI HY *et al.*, 2012), a qual é comprometida possivelmente através da alteração do equilíbrio da resposta Th1/Th2 (KRUTZIK SR *et al.*, 2003; LORENZ E. *et al.*, 2000).

Várias evidências sugerem que micobactérias patogênicas desenvolvem mecanismos para manipular as vias de sinalização induzidas pelos TLR (CREVEL VR *et al.*, 2002). Essas micobactérias utilizam mecanismos como, interferência na maturação e função de células dendríticas (GEIJTENBEEK TB *et al.*, 2003), bloqueio no processamento de antígenos pelo MHC-II e redução na apresentação aos linfócitos T CD4 (NOSS EH *et al.*, 2001) entre outros, para escapar e/ou suprimir a resposta imune protetora.

O papel de TLR na modulação das funções de células reguladoras em doenças é relevante, considerando que interações com TLRs podem tanto aumentar ou limitar a capacidade supressora de Tregs (SUTMULLER R *et al.*, 2007). O TLR2, após estímulos microbianos, atua na regulação negativa desviando a resposta imune, através da indução de células reguladoras, respostas TH2 e interleucina 10 (IL-10) (MANICASSAMY S *et al.*, 2009). A conexão entre TLRs e Tregs no processo de controle da resposta imune *in vivo* foi demonstrada através de evidências da participação do receptor TLR2 no controle da função de células T reguladoras (SUTMULLER R *et al.*, 2006), onde a redução na expressão de FOXP3 foi sugerida como um provável mecanismo para a modulação dessa resposta (LIU H *et al.*, 2006).

Proteínas de choque térmico e componentes da matriz extracelular contendo ácido hialurônico, liberados por células sofrendo necrose ou já necrosadas, podem se ligar a TLR2 e/ou TLR4, ativando ou suprimindo a função das Tregs, dependendo da via sinalizada (BELKAID Y & TARBELL, 2009). O uso de LPS (lipopolissacarídeo) na estimulação de TLR4 é eficaz na promoção do aumento da proliferação, sobrevivência e atividade supressora dessas células e demonstra um provável mecanismo para o controle de respostas inflamatórias (CARAMALHO I *et al.*, 2003). Dessa forma, o fenômeno de controle da resposta de células T via TLRs é visto como uma importante ferramenta na modulação da função dessas células nas doenças infecciosas, nas autoimunes e no câncer (SUTMULLER *et al.*, 2006). No entanto, sua manipulação, possui um efeito dicotômico, tanto para o direcionamento de respostas pró-inflamatórias quanto para o desenvolvimento de respostas reguladoras e necessita ser melhor investigado. Assim, a participação de TLRs na imunopatologia da infecção pelo Mtb é um ponto muito importante, visto que sua sinalização é um dos mecanismos responsáveis pela promoção da comunicação de forma eficiente entre a imunidade inata e adaptativa e o estabelecimento da interação patógeno-hospedeiro crítico para o controle da infecção. Em virtude disso, faz-se necessário esclarecer o papel dos TLRs na instalação da tuberculose em sua forma latente ou naquela que resulta em infecção clinicamente ativa.

Dados existentes na literatura demonstram que a taxa de incidência de tuberculose atribuída à reinfecção após alta por cura (sucesso no tratamento) foi quatro vezes maior do que novos episódios de tuberculose, sugerindo que indivíduos que tiveram tuberculose apresentam um risco elevado de desenvolverem novamente a doença quando reinfectedos (VERVER *et al.*, 2005); e que a maioria dos casos de TB existentes, não são devido a novas infecções e sim a reativação da infecção latente do Mtb nestes indivíduos (GENGENBACHER M & KAUFMANN SHE, 2012). Neste contexto, a pré-exposição ao Mtb pode ser um fator determinante na susceptibilidade à doença. O fato de que cerca de dois bilhões de pessoas, um terço da população mundial, esteja infectada por Mtb em sua forma latente (DYE C *et al.*, 1999), sugere que esses indivíduos são potencialmente o maior reservatório de transmissão da doença. Embora a maioria destes indivíduos não vá morrer de tuberculose, o grande perigo está na reativação dos casos e na transmissão silenciosa da TB para seus contactantes (LING LIN P & FLYNN JL, 2010). Portanto a latência é um grande obstáculo para alcançar o controle global da TB.

Considerando-se que: 1) a capacidade de controlar a infecção pelo *M. tuberculosis* está fortemente correlacionada com as funções imunológicas do hospedeiro; 2) que para

estabelecer uma infecção latente o Mtb pode interferir na sinalização da resposta inata (via TLR) para neutralizar respostas imunes protetoras; e 3) as diferenças individuais na capacidade de estabelecer uma resposta imune adequada poderiam explicar a manutenção da forma latente da doença. Torna-se imprescindível a realização de estudos que comparem as respostas de indivíduos positivos e negativos para o PPD, na tentativa de compreender o espectro da tuberculose latente.

Neste trabalho, pretendemos estudar os mecanismos envolvidos na interação entre os receptores inatos TLRs e as células da imunidade adaptativa, a fim de melhor compreender os mecanismos imunológicos relacionadas no direcionamento, desenvolvimento e progressão da infecção, possibilitando um melhor desenvolvimento futuro, de estratégias terapêuticas, profiláticas e de diagnóstico para o controle dessa doença.

## **2. Objetivos**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de receptores do tipo Toll 2 e 4 na resposta imune de indivíduos sadios reativos ou não ao teste tuberculínico (PPD+ e PPD-) frente ao desafio *in vitro* com *Mycobacterium tuberculosis*.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o papel dos receptores TLR2 e TLR4:

1. No número de células T reguladoras;
2. Na atividade microbicida de macrófagos;
3. Na produção das citocinas IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ ;
4. Na produção de óxido nítrico.

### **3. Materiais e Métodos**

### 3.1 Modelo do estudo

O presente trabalho constituiu um estudo descritivo, transversal, a fim de avaliar o papel *in vitro* de receptores tipo Toll na resposta imune de indivíduos saudáveis reativos ou não ao teste tuberculínico e a influência desse receptor na proliferação do Mtb em culturas de sangue total. O estudo foi conduzido nos laboratórios de Micobacteriologia e de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

### 3.2 Amostra do estudo

Critérios de inclusão:

- Se enquadrar em qualquer um dos grupos descritos abaixo.
- Ter idade maior que dezoito anos.
- Não ser portador do vírus do HIV, hepatite ou qualquer outra doença crônica ou imunodeficiência.
- Aceitar os termos presentes no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo CEP-ES.

Assim, foram arrolados 24 voluntários conforme detalhado abaixo, com idades entre 18 e 60 anos, identificados pelo resultado do teste tuberculínico (método Mantoux). Desta forma, foi aplicado 1 UI (0,02mcg) da tuberculina RT-23 por via intradérmica no terço médio da face anterior do braço dos participantes e após 72 horas, o resultado do teste foi interpretado, de acordo com a American Thoracic Society e com guideline do Centro de Controle e Prevenção de Doenças Infecciosas. A aplicação e interpretação do teste foi realizada na clínica do Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM) ou no ambulatório do Núcleo de Doenças Infecciosas por profissionais de saúde devidamente treinados. Os grupos foram formados por:

- 1) 13 Indivíduos com teste intradérmico com PPD (*purified protein derivative*) positivo (PPD+). Foram identificados como positivos, indivíduos que apresentaram valor de leitura igual ou superior a 10mm.
- 2) 11 Indivíduos com teste intradérmico com PPD (*purified protein derivative*) negativo (PPD-). Foram identificados como negativos, indivíduos que apresentaram valor de leitura menor que 5mm.

Os voluntários foram arrolados ao longo do estudo e não foram utilizados para todos os experimentos.

### 3.3 Coleta e conservação das amostras

As amostras de sangue foram obtidas utilizando o método de coleta a vácuo em tubo de coleta com heparina sódica (Tubo Vacutainer). De cada indivíduo, foram coletados 20 mL de sangue, sendo esse processado, armazenado e utilizado seguindo a necessidade de cada experimento.

### 3.4 Seleção e preparo do isolado de *Mycobacterium tuberculosis*

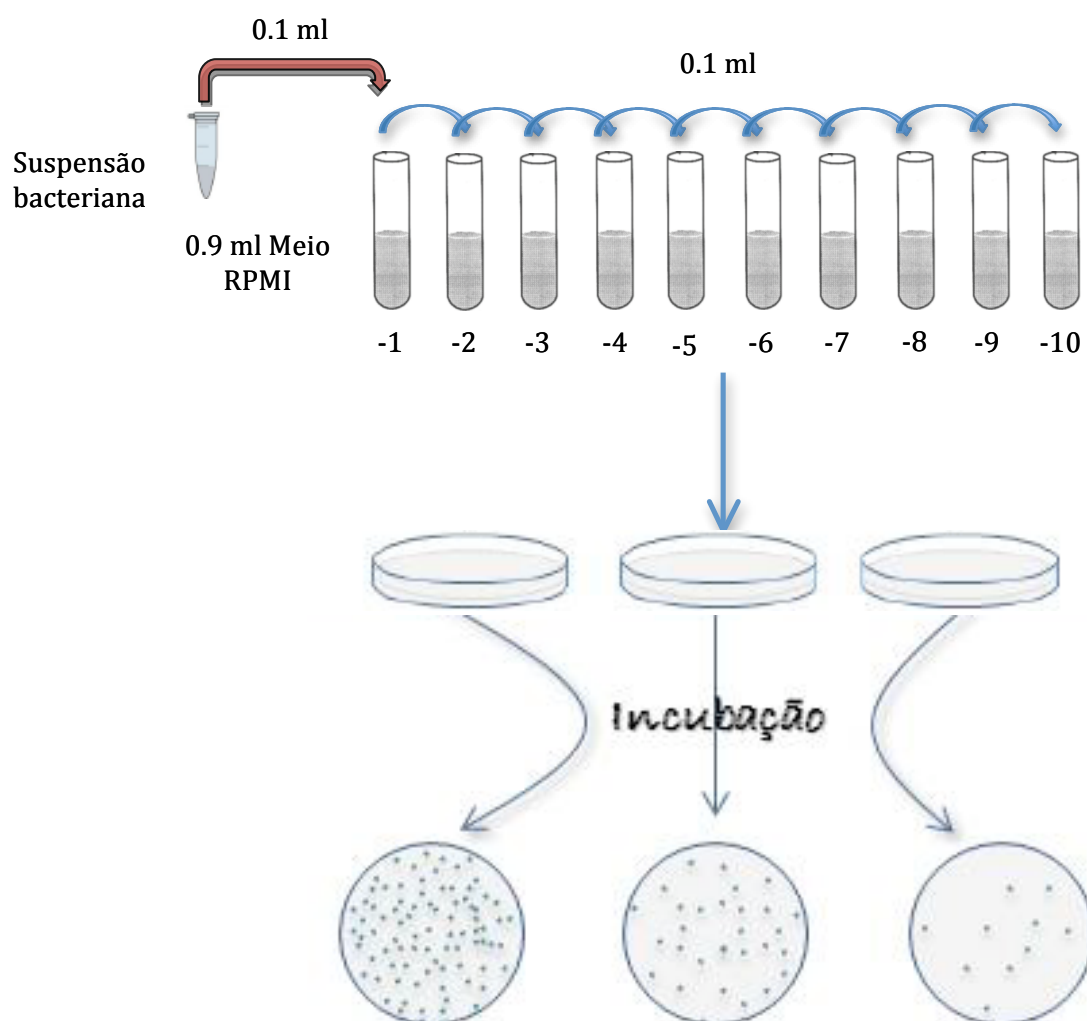
Para o modelo experimental de infecção micobacteriana *in vitro* foi utilizada a cepa ATCC 27294 (H37Rv), como referência de virulência. A cepa foi crescida em meio de cultura (Ogawa-Kudoh-OK) a 37°C durante 21 dias, onde a bactéria encontrase em fase logarítmica de crescimento. Após a multiplicação, as colônias foram retiradas do frasco de cultura com auxílio da alça bacteriológica e inoculadas em tubos com tampa de rosca contendo pérolas de vidro e 2 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) com 0,05% de Tween 80. Em seguida, o tubo foi agitado por 1 minuto, a fim de romper os grumos da micobactéria. Após a agitação o tubo permaneceu em repouso por 30 minutos. O sobrenadante obtido após esse período foi retirado utilizando pipeta Pasteur e armazenado em outro tubo com tampa de rosca, sendo agitado rapidamente e sempre que utilizado, no intuito de manter a suspensão homogênea. Em paralelo, foram separados e preparados tubos de rosca sem pérolas de vidro, contendo 5 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) com 0,05% de Tween 80. A esses, foram adicionados algumas gotas da suspensão bacteriana devidamente homogeneizada. Para verificar a concentração bacteriana obtida, a densidade óptica (DO) da suspensão foi medida em espectrofotômetro a 265nm, sendo ajustada para o valor desejado (DO=1). Para isso, foi adicionado PBS (*phosphate buffered saline*) com 0,05% de Tween 80, quando a DO estava com valor acima do desejado ou acrescentado a suspensão da bactéria quando o valor da DO estava abaixo do esperado. O volume de 10 mL do conteúdo obtido foi transferido para um tubo plástico de 50 mL e centrifugado a 6000 rpm, sem freio, durante 30 minutos para formação do *pellet* contendo as micobactérias. Posteriormente o sobrenadante foi cuidadosamente retirado, o *pellet* ressuspensionado em 50 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) com 0,05% de Tween 80 e novamente centrifugado a 6000 rpm, sem freio, durante 30 minutos (primeira lavagem). Após a segunda lavagem, o *pellet* foi ressuspensionado em 1,56 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) com 80% de Glicerol e 3,44 mL de 7H9 suplementado com OADC, homogeneizado, aliquotado no volume de 0,5 mL em criotubos e armazenados a



-70°C. Antes do uso, a alíquota foi retirada do armazenamento e descongelada em estufa a 37°C por uma hora, seguindo-se 3 ciclos de sonicação em *Lysor* por 10 segundos, com intervalos de 5 minutos cada, para reduzir os agregados da micobactéria.

### 3.5 Quantificação da concentração de infecção - Cepa ATCC 27294 (H37Rv)

Após o congelamento das alíquotas, as suspensões micobacterianas foram descongeladas e utilizadas para padronizar a concentração estoque obtida, como ilustrado na figura 1.



**Figura 1:** Esquema utilizado para a realização da diluição seriada.

Para isso, após a sonicação, seguiu-se a diluição seriada da suspensão em RPMI 1640 (*SIGMA-Aldrich*) Completo (Soro Fetal Bovino Inativado, L-Glutamina, *HEPES* 1M - *Gibco Invitrogen*). Assim, como ilustrado na figura 1, foi adicionado a

tubos de vidro, 0.9 ml de RPMI Completo e transferido 0.1 mL da suspensão bacteriana homogeneizada para o primeiro tubo, equivalente a diluição 1:10. O processo foi repetido, até a diluição 1:10.000.000.000 e de cada uma delas foi plaqueado 3 inóculos de 0.03 mL em placas tri-partidas contendo meio *Middlebrook* 7H11 (*Becton Dickinson*), *Middlebrook* OADC *Enrichment* (*Becton Dickinson*) e Glicerol (Vetec – C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>(OH)<sub>3</sub>).

O crescimento bacteriano foi acompanhado por 21 dias em estufa a 37°C, sendo realizada a contagem das colônias no 14º e 21º dia. O número de colônias observadas foi utilizado para determinar a concentração bacteriana armazenada e para cada experimento de infecção esse procedimento foi repetido mantendo-se o Controle da Concentração do Inóculo (CCI). Para infecção das culturas de sangue total, utilizava-se a diluição da bactéria para o MOI (*multiplicity of infection*) de 1:1 (uma bactéria para 1 macrófago), respeitando-se o valor normal de cerca de 1 x 10<sup>6</sup> de leucócitos por indivíduo, dos quais cerca de 10% são monócitos (10<sup>5</sup>).

### **3.6 Ensaios da atividade dos receptores tipo *Toll***

#### **3.6.1 Preparo do sangue total - Modulação do sinal de TLR2 e TLR4**

A fim de avaliar o papel dos receptores tipo *Toll* (TLR2 e TLR4) frente à infecção com *Mtb*, as amostras de sangue total obtida dos participantes do estudo foram pré-tradadas com propósito de modular a resposta desses receptores durante o contato com o patógeno. Assim, o sangue total foi misturado no volume de 1:1 com soro AB humano (human serum AB, Sigma-Aldrich), no intuito de reduzir ligações inespecíficas do anticorpo antagonista do receptor e permanecia em rotação contínua a 37°C, por 30 minutos. Após essa incubação, a mistura foi centrifugada a 1500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado e descartado. O volume do sobrenadante retirado foi completado com RPMI 1640 (*SIGMA-Aldrich*) Completo (Soro Fetal Bovino Inativado, L-Glutamina, *HEPES* 1M - *Gibco Invitrogen*). Para regulação da atividade de cada receptor isoladamente, 1 mL dessa mistura foi disposto em tubo plástico de 1,5 mL e adicionados 5 µg/mL de anticorpo antagonista de TLR (anti-TLR2, clone TL2.1 ou anti-TLR4, clone HTA125, *IMGENEX*). O antagonista foi adicionado ao sangue, permanecia em rotação contínua por 1 hora em temperatura ambiente e seguia para a infecção com a cepa ATCC 27294 (H37Rv).

### 3.6.2 Infecção do sangue total *in vitro* com *M. tuberculosis*.

Primeiramente para cultura de sangue total foram identificados tubos plásticos de 1,5 mL. O tubo A, correspondia ao tubo controle, a ele, foi adicionado, a mistura de sangue tratado com soro AB, suspenso em RPMI 1640 (*SIGMA-Aldrich*) Completo (Soro Fetal Bovino Inativado, L-Glutamina, *HEPES* 1M - *Gibco Invitrogen*). O tubo B representava o controle positivo, este recebia a mistura de sangue tratado com soro AB, suspenso em RPMI 1640 (*SIGMA-Aldrich*) Completo (Soro Fetal Bovino Inativado, L-Glutamina, *HEPES* 1M - *Gibco Invitrogen*) e a suspensão bacteriana da cepa ATCC 27294 (H37Rv), na concentração de 1:1 (uma bactéria para 1 macrófago). No tubo C, foi adicionado o sangue após todo o tratamento para modular o sinal de TLR2 e a suspensão bacteriana da cepa ATCC 27294 (H37Rv), na concentração de 1:1 (uma bactéria para 1 macrófago). Ao tubo D, foi adicionado o sangue após todo o tratamento para modular o sinal de TLR4 e a suspensão bacteriana da cepa ATCC 27294 (H37Rv), na concentração de 1:1 (uma bactéria para 1 macrófago). Assim, os tubos permaneciam em cultura com rotação contínua a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 4 e 72 horas e foram usados separadamente em cada tempo de cultura nos experimentos de citometria de fluxo e atividade microbiana.

### 3.6.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Posteriormente ao tempo de incubação das culturas de sangue total (4 e 72 horas), foi avaliada a capacidade proliferativa de linfócitos T reguladores durante a infecção. Para caracterizar o fenótipo dessa população celular, utilizamos anticorpos adquiridos junto a BD (*Becton, Dickinson and Company*) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

Desta forma, foram pesquisados marcadores extracelulares para os receptores CD4 e CD25 e um marcador intracelular para o fator de transcrição nuclear *foxp3*. A expressão conjunta desses marcadores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) define a população de linfócitos T reguladores no estudo. Para verificação de ligações inespecíficas, utilizamos anticorpos murinos, específicos para imunoglobulinas de camundongo. O controle da técnica foi realizado através das definições de compensação e otimização do aparelho FACScalibur (BD bioscience), a fim de retirar a interferência e sobreposição espectral dos fluorocromos utilizados.

A tabela 1 demonstra os anticorpos utilizados durante o estudo.

**Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.**

<i>Tubos</i>	<i>Anticorpos</i>	<i>Marcadores</i>	<i>Clone</i>
Controle Isotópico (1 etapa)	Anti-IgG-1	PE	P3
	Anti-IgG-2a	FITC-	eBM2a
	Anti-IgG-2b	PE-Cy5	eBMG2b
Células T Reguladoras (2 etapas)	Anti-CD4	PE-Cy5	RPA-T4
	Anti-CD25	FITC	BC96
	Anti- <i>FoxP3</i>	PE	236A/E7

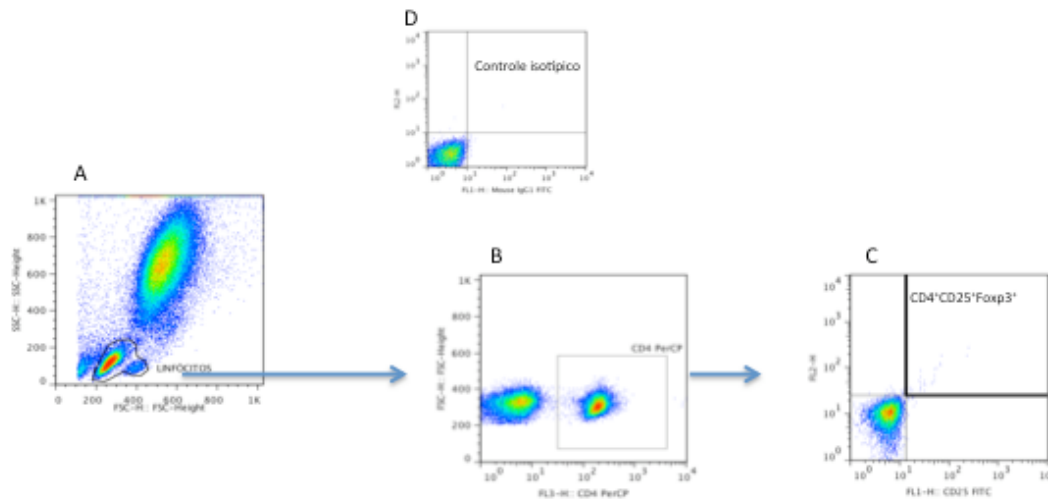
Assim, para cada marcação celular, foram retirados dos tubos em cultura 0,2 mL de sangue. Para primeira etapa da fenotipagem, foram adicionados ao sangue, 0,02 mL de cada anticorpo em tubos de polipropileno, específicos para citometria de fluxo. Esses permaneceram incubados por 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Após essa incubação, os eritrócitos foram lisados com 0.1 mL de solução de lise (BD FACS lysing solution), diluída 10 vezes, por 15 minutos em temperatura ambiente. Então, os tubos foram centrifugados a 1400 rpm por 7 minutos e o sobrenadante descartado. A suspensão de célula obtida depois da lise foi lavada com 1 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) gelado e centrifugada a 1400 rpm por 7 minutos. A partir desse ponto, os tubos identificados para o controle isotópico foram suspensos em Macs Facs, onde as células permaneceriam fixadas e aguardavam a leitura.

A segunda etapa da fenotipagem é intracelular e exclusiva para o fator de transcrição nuclear *foxp3*. Desta forma, aos tubos identificados para caracterização das células T reguladoras adicionava-se, 0,1 ml de solução de fixação (eBioscience IC Fixation Buffer). Essas permaneceriam incubadas por 30 minutos e foram lavadas com 0,1 ml de solução de permeabilização BD (eBioscience 10x Permeabilization Buffer). O sobrenadante obtido foi descartado após uma centrifugação a 1400 rpm por 5 minutos e as células foram suspensas em 0.1 ml de solução de permeabilização BD (eBioscience 10x Permeabilization Buffer) e 0,02 ml do anticorpo anti- *foxp3*. Esses permaneceriam incubados por 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz, foram novamente lavados com 1 mL de solução de permeabilização BD (eBioscience 10x Permeabilization Buffer), centrifugados a 1400 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Por fim, as células foram suspensas em solução de fixação (Macs Facs-

paraformaldeído 1%) e aguardavam 2 horas para leitura no aparelho FACScalibur (BD bioscience).

A aquisição e leitura das células foram realizadas através do programa BD CELLQUEST Pro e os resultados obtidos foram analisados pelo programa FLOWJO versão 7.6.5. A análise das características fenotípicas da população estudada foi realizada através dos parâmetros de tamanho (FSC - *Foward Scatter*), granulosidade (SSC - *Side Scatter*) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com fluorescein isothiocyanate (FITC), *Phicoerithrin* (PE) e *Phycoerythrin-Cy5* (PE-Cy5). Foram adquiridos para essa avaliação 100.000 eventos para análise da população caracterizada como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e 25.000 eventos para o controle isotópico da marcação celular.

A figura 2 ilustra o processo de análise das amostras estudadas, de acordo com os parâmetros acima citados. Primeiramente foi determinada a população de linfócitos T baseada em aspectos morfométricos através de gráficos de distribuição pontual de tamanho *versus* granulosidade com a seleção da região de interesse (Figura A). A partir da seleção dessa população, foram separados os linfócitos CD4<sup>+</sup>, identificados pelo tamanho celular e expressão desse marcador em FL3 (Figura B). Em seguida, foram identificados os eventos de células T reguladoras, com base na expressão dos marcadores CD25 e *foxp3*, cujas fluorescências foram captadas em FL1 e FL2 (Figura C). A figura D representa a avaliação da presença de ligações inespecíficas detectadas por FL1 *versus* FL2.



**Figura 2:** Representação do processo de análise das amostras estudadas por citometria de fluxo através do programa FLOWJO 7.6.5. A) Seleção da população de linfócitos, através dos parâmetros de granulosidade *versus* tamanho. B) Representação do controle isotípico, com baixa presença de ligações inespecíficas. C) Seleção de células CD4<sup>+</sup> por meio dos parâmetros tamanho *versus* fluorescência relativa detectada por FL3. D) Quantificação dos eventos de células T reguladoras mediante a emissão da fluorescência relativa detectada em FL2 *versus* FL1.

### 3.6.4 Avaliação da Atividade Microbicida no sangue total.

Para investigação da atividade microbicida, utilizava-se o volume final de 0.6 mL restantes da cultura de sangue total. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm, retirava-se 400 µl do sobrenadante obtido e armazenava-o a -70 °C para posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico. Adiciona-se então, 900 µl de água estéril a cada tubo da cultura para promover a lise das células e fagócitos liberando para o meio as bactérias. Os tubos foram agitados por 30 segundos e permaneciam em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, seguidos de uma nova agitação e centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, foram removidos e descartados 800 µl do sobrenadante de cada tubo. Do volume restante foram realizadas diluições seriadas em PBS (*phosphate buffered saline*) com 0,05% de Tween 80. De acordo com a concentração de infecção, realizavam-se quatro diluições da amostra, sendo plaqueadas as diluições de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-4</sup> em placas de Petri tripartidas contendo meio *Middlebrook 7H11* (*Becton Dickinson*), *Middlebrook OADC Enrichment* (*Becton Dickinson*) e Glicerol (Vetec – C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>(OH)<sub>3</sub>). Após o plaqueamento as placas foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e

acompanhadas durante 21 dias, sendo realizada a contagem das colônias no 14º e 21º dia.

### **3.6.5 Dosagem de NO**

A dosagem de NO foi realizada através do método de detecção baseado na reação do nitrito com reagente de Griess. Primeiramente, foi preparada uma solução a 50mM de NaNO<sub>2</sub>, para elaboração da curva padrão, e foi adicionando a placa 0.5 mL dessa solução diluída 1000X, iniciando a curva em 50 µM com diluição na razão de 2, em Meio RPMI. Para reação de Griess foram adicionados a placa de 96 poços, 0.5 ml da amostra e 0.5 mL da solução de trabalho (Solução A: 0.1 % de Naftiletlenodiamina em água destilada; Solução B: 1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico; As soluções devem ser misturadas no volume 1:1 na hora do uso e devem ser armazenadas a 4°C em frascos de vidro e protegidos da luz). Para o branco foi utilizado, 0.5 ml de RPMI completo e 0.5 mL de solução de Griess. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 570nm em leitor de placa SpectraMax M3 (Molecular Devices).

### **3.6.6 Detecção e quantificação de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

Para o ensaio imunoenzimático, foi utilizado o teste Human ELISA Ready-SET-Go!, (EBioscience, Inc. California, San Diego, USA). Desta forma, as amostras de 72 horas de cultura foram devidamente armazenadas a -70°C e foram utilizadas para quantificação de IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ . O teste baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais específicos para cada um dos marcadores acima e foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante.

Primeiramente, microplacas de 96 poços de alta afinidade (COSTAR 9018 - Corning Life Sciences), foram sensibilizadas utilizando-se 50 µL/poço de uma solução de anticorpos monoclonais de captura (250X), diluídos em uma solução tamponada (Coating Buffer 1x) e permaneceram por um período de 12 horas (overnight) a 4°C. Após a incubação as placas foram lavadas cinco vezes com 300 µL/poço de uma solução com PBS 1X e 0,05% de Tween-20, entre cada lavagem foi respeitado o tempo de um minuto (“Tempo de molho”). Terminada a lavagem, foi iniciado o bloqueio de sítios inespecíficos da placa, adicionando aos poços 200µL de solução diluente (Assay Diluent 1X), com a finalidade de preencher os espaços não

ocupados pelo anticorpo de captura. A placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente e lavada novamente, seguindo o processo descrito anteriormente.

Para os testes de IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$  foram adicionados 50 $\mu$ L de amostra em cada poço, sendo que para as dosagens de IL-10 e IFN- $\gamma$  as amostras foram previamente diluídas 10 vezes com solução diluente (Assay Diluent 1X), e os valores ajustados após a dosagem utilizando-se o fator de diluição de 10X. Para a detecção e quantificação da citocina TGF- $\beta$ , 100  $\mu$ L das amostras foram tratados com 20  $\mu$ L de HCl [1N] a fim de que as formas latentes desta citocina fossem ativadas em formas imunorreativas. As amostras foram incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida neutralizadas com 20  $\mu$ L de NaOH [1N]. Nesta etapa também foi preparado à curva padrão a partir de diluições seriadas (1:2) da solução padrão dos testes (Top standard solution). A diluição para a curva padrão foi realizada respeitando a sensibilidade pré-estabelecida de cada teste (Standard Curve Range) sendo de 300 pg/mL a 2 pg/mL para IL-10, 200 pg/mL a 2 pg/mL para IL-4, 500 pg/mL a 4 pg/mL para IFN- $\gamma$  e de 8000 pg/mL a 60 pg/mL para o TGF- $\beta$ . Em todas as dosagens foram utilizados poços com o branco do teste (50 $\mu$ L de Assay Diluent 1X) e para a dosagem de TGF- $\beta$ , além do branco, foram aplicados 50 $\mu$ L de meio de cultura (RPMI completo) previamente acidificado e neutralizado, já que o soro fetal bovino poderia conter níveis altos de TGF- $\beta$ .

Após a aplicação das amostras e padrões, as placas foram incubadas por 12h (overnight) a 4°C e lavadas cinco vezes com 300  $\mu$ L/poço de uma solução com PBS 1X e 0,05% de Tween-20. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L/poço do anticorpo de detecção (250X), diluídos em Assay Diluent 1X, e as placas foram novamente incubadas por uma 1h, seguida de novas lavagens.

Foi então adicionado 50 $\mu$ L/poço de uma solução de avidina-HRP (250X) diluída, incubando-se por 30 minutos. As placas foram lavadas setes vezes, com tempo de molho de 1 a 2 minutos e adicionou-se 50  $\mu$ L/poço de uma solução substrato TMB 1X (Tetrametilbenzidina). Após 15 minutos foi adicionado aos poços 25  $\mu$ L da solução de parada (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [1M]) e realizou-se a leitura em leitor de placa SpectraMax M3 (*Molecular Devices*) utilizando a diferença entre os comprimentos de onda de 570nm e 450nm. Os valores obtidos com o padrão foram utilizados para a construção da equação da reta. Os resultados das amostras foram submetidos na equação da reta e de seus resultados foram subtraídos os valores dos controles das amostras, retirando assim qualquer interferente relacionado às citocinas basais.



### **3.7 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para comparação de dados com distribuição paramétrica entre grupos, foi utilizado o teste T pareado para amostras pareadas e o teste T não pareado para relações intergrupos. A análise de correlação entre as variáveis estudadas foi realizada utilizando o teste de Spearman. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

### **3.8 Considerações éticas**

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. A aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico (CEP) foi obtida em 30 de agosto de 2012, registro n 04342812.0.0000.5060.

## **4. Resultados**

#### 4.1. Caracterização dos indivíduos estudados

Vinte e quatro voluntários clinicamente saudáveis, sendo 13 indivíduos com reação positiva e 11 indivíduos com reação negativa ao teste tuberculínico (PPD) aceitaram para participar de nosso estudo. Dados demográficos dos participantes são apresentados na tabela 2.

**Tabela 2: Dados demográficos dos indivíduos clinicamente saudáveis reativos ou não ao PPD (*purified protein derivative*).**

Grupos	Indivíduos	Idade (anos)		Valor PPD (mm)	
		Média +/- Desvio Padrão		Média +/- Desvio Padrão	
<b>PPD positivo</b>	13				
Masculino	2	26,5 +/- 2,1	} p=0,05	1,5 +/- 0,7	} p=0,001
Feminino	11	31,1 +/- 9,1		16,6 +/- 7,4	
<b>PPD negativo</b>	11				
Masculino	2	39,5 +/- 10,6	} p=0,0003	0 +/- 0	} p=0,06
Feminino	9	27,2 +/- 5,9		0,6 +/- 1,3	

#### 4.2. Frequência de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) nas culturas de sangue total infectadas com *M. Tuberculosis* (cepa H37Rv).

Com o objetivo de avaliar a frequência de células T reguladoras *in vitro* durante infecção pelo Mtb, e o papel dos receptores TLR2 e TLR4 na modulação dessa população celular, realizamos a análise fenotípica de Tregs, através de citometria de fluxo, em amostras de sangue total dos grupos PPD- (n=10) e PPD+ (n=11) em dois tempos distintos, 4 e 72 horas após exposição à cepa H37Rv.

A análise dos grupos isolados revelou um aumento significativo da população de Tregs em indivíduos positivos ao teste tuberculínico (PPD+) na presença de Mtb (figura 3). Esse aumento mostrou-se significativo durante todo o experimento, tanto nos tempos de 4 e 72 horas de incubação pós infecção. Essa rápida expansão das células T reguladoras sugere a presença de uma população de memória com o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> em indivíduos PPD+, fenômeno não observado entre indivíduos do grupo PPD-. O bloqueio seletivo de TLRs através de antagonistas específicos demonstrou que a infecção com a cepa H37Rv na presença do antagonista de TLR2 levou a uma redução significativa de células Tregs após 72 horas de infecção em

indivíduos PPD+. Apesar de observarmos também uma redução na frequência de Tregs na presença de antagonista de TLR4, esse efeito não foi significativo, sugerindo uma maior participação do receptor TLR2 na modulação das Tregs. Por outro lado, entre indivíduos PPD-, apesar de uma pequena redução na frequência de Tregs ter sido observada após o bloqueio com antagonistas de TLR2 e TLR4, essa diferença não foi significativa.

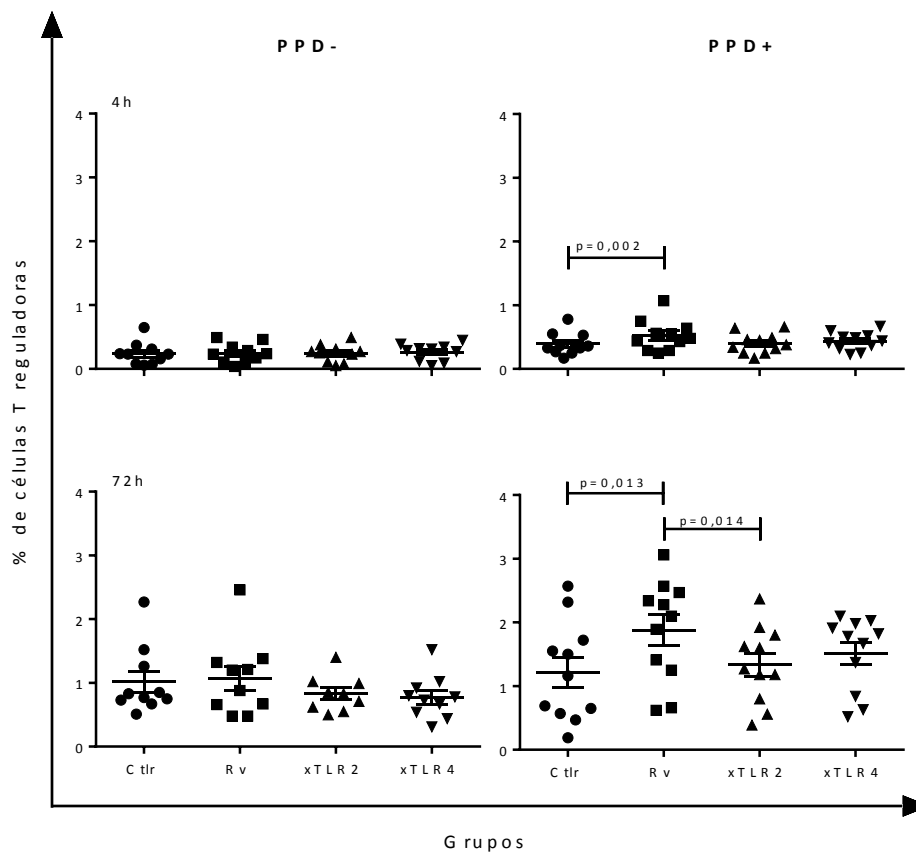


Figura 3: Análise fenotípica por citometria de fluxo da frequência de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) em amostras de cultura de sangue total dos grupos PPD- e PPD+ incubadas por 4 e 72 horas com a cepa H37Rv, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. Os resultados estão expressos em média do percentual de células e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ .

Após analisarmos os dados intragrupo, seguimos para a comparação dos resultados obtidos entre os grupos PPD- e PPD+ (figura 4). Observamos que o estímulo com a cepa H37Rv de Mtb levou a um aumento significativo na frequência de células Tregs no grupo PPD+ quando comparado ao grupo PPD-. Esse aumento nos indivíduos PPD+ foi observado em todos os tempos de infecção (4 e 72 horas), mesmo após o bloqueio dos receptores TLR2 e TLR4. Assim, embora a participação dos TLRs possa modular a frequência dessas células como observado na Figura 3, o

bloqueio do TLR2 apesar de estar associado com uma diminuição na frequência de Tregs, não produziu uma redução a níveis semelhantes àqueles observados entre os indivíduos PPD-.

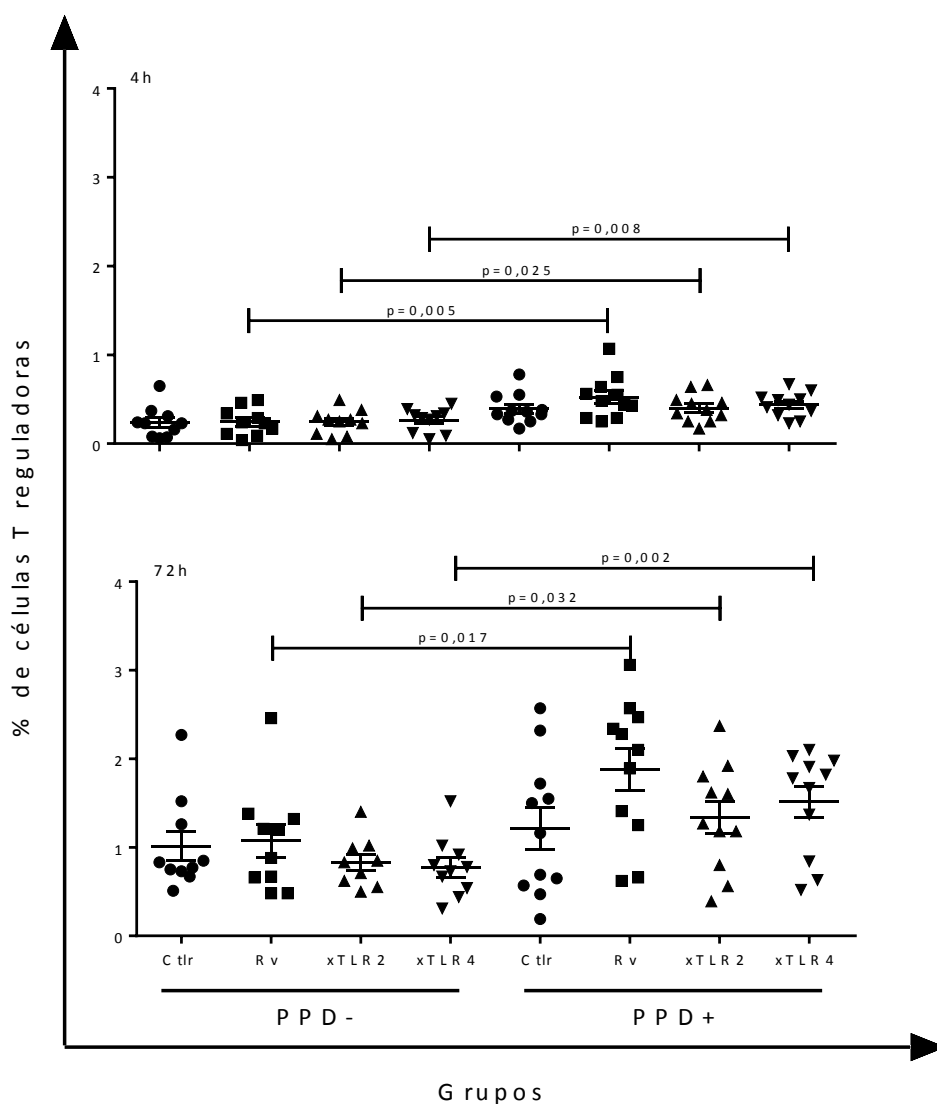


Figura 4: Análise fenotípica por citometria de fluxo da frequência de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) em amostras de cultura de sangue total entre os grupos PPD- e PPD+ incubadas por 4 e 72 horas com a cepa H37Rv, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. Os resultados estão expressos em média do percentual de células e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ .

Esses dados sugerem que no evento de uma re-exposição/infecção indivíduos com exposição prévia ao Mtb (PPD+), como aqui simulado pela exposição *in vitro* com a cepa H37Rv, estão mais propensos a desenvolverem uma resposta imune reguladora, caracterizada pelo aumento na população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, o que

poderia comprometer o desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra o Mtb.

#### **4.3. Capacidade microbicida dos indivíduos PPD+ e PPD- em culturas de sangue total.**

Com o objetivo de avaliar a atividade microbicida nos grupos estudados e a existência de uma possível modulação da mesma pelos receptores TLR2 e TLR4 nesse importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra o Mtb, realizamos o ensaio de Atividade Microbicida no Sangue Total (*Whole Blood Killing Assay - WBKA*). Dessa forma, foram realizadas culturas de sangue total utilizando-se separadamente amostras de cada um dos indivíduos (PPD+ e PPD-), as quais foram incubadas por 4 e 72 horas na presença da cepa H37Rv.

Indivíduos PPD- durante a infecção *in vitro* com a cepa virulenta de Mtb, apresentaram uma redução significativa no número de colônias na presença do antagonista anti-TLR4 (figura 5). Essa redução foi observada em todos os tempos da cultura (4 e 72 horas) e ocorreu apenas em relação ao uso do antagonista anti-TLR2, já que a infecção realizada somente na presença da cepa H37Rv, não gerou diferenças significativas dentro desse grupo. Dessa forma, essa diferença visualizada entre os grupos com a neutralização da atividade dos receptores *TLR* sugere uma atividade contrária desses receptores, onde o uso de antagonista para o receptor TLR2, pode levar a um aumento no número de colônias, e o uso do antagonista para o receptor TLR4 uma redução na concentração bacilar.

Essa observação pode ser melhor visualizada no grupo PPD+. No tempo de 4 horas o grupo PPD+ apresentou um aumento significativo no número de colônias na presença de anti-TLR2 quando comparado com a infecção controle, a qual continha apenas a cepa H37Rv. Esse dado reforça nossa hipótese que o bloqueio desse receptor influencia de maneira negativa na atividade microbicida durante a infecção com Mtb. Os indivíduos PPD+ se assemelharam aos PPD- na redução do número de colônias quando antagonista de TLR4 foi adicionado à cultura antes da infecção com a cepa H37Rv. Essa redução foi significativa em relação ao uso de anti-TLR2 nos tempos de 4 e 72 horas, fortalecendo a observação que na atividade microbicida, o receptor TLR4 tem efeito oposto ao TLR2, e sua neutralização, pode estar relacionada a uma melhora nessa atividade celular. Essa observação fica patente, no tempo de 72 horas, onde observamos também uma diferença significativa na redução do número de colônias ao

comparar a infecção com a cepa H37Rv e aquela na presença do antagonista anti-TLR4. Essa observação sugere que o bloqueio de TLR4 favorece o estabelecimento de uma atividade microbicida eficaz contra o Mtb.

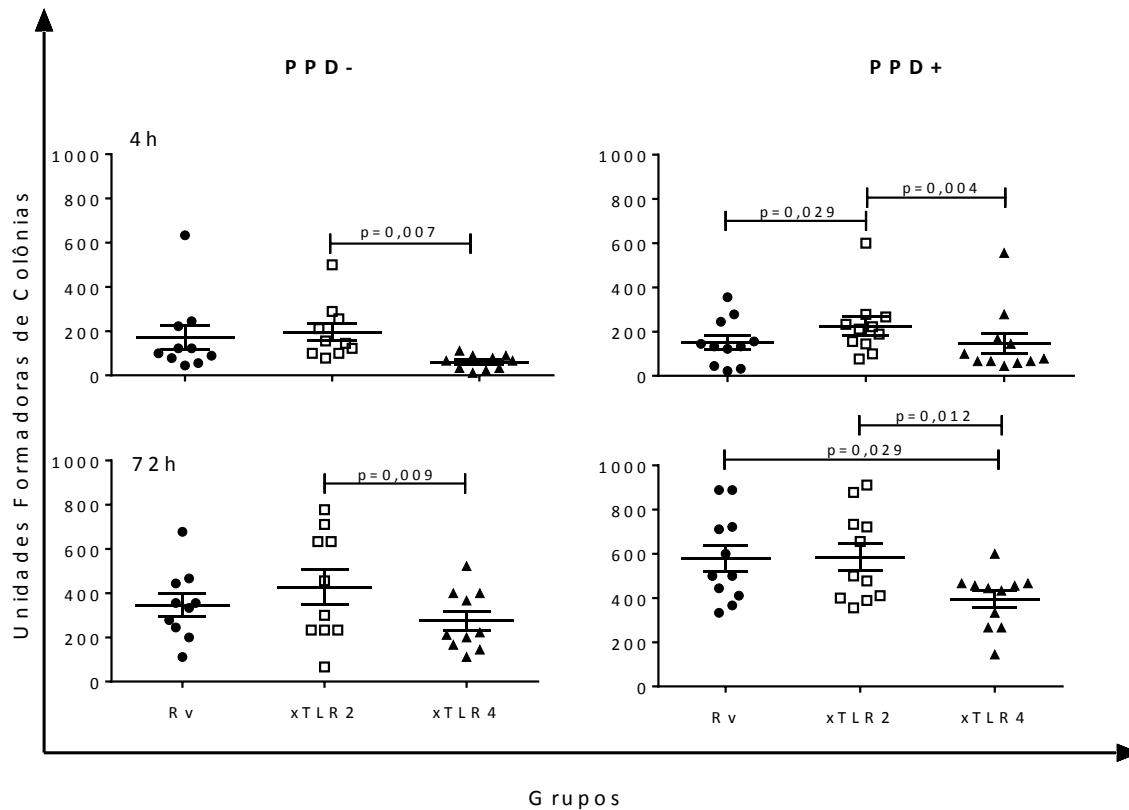


Figura 5: Capacidade microbicida em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- incubadas por 4 e 72 horas com a cepa H37Rv, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. Os resultados estão expressos em média da concentração bacilar (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ .

A comparação da atividade microbicida entre os grupos PPD- e PPD+ (figura 6), confirmou dados anteriores de nosso laboratório (CAMPANA MCF, 2010; STRINGARI LL, 2012), revelando um aumento significativo no número de unidades formadoras de colônias (UFC) entre os indivíduos PPD+ após 72 horas de infecção. Esse dado sugere que mesmo possuindo uma memória imunológica específica contra o bacilo, o grupo PPD+ apresenta uma atividade microbicida inferior ao grupo PPD-. Esses dados sugerem ainda que essa diferença observada depende do período de incubação, sendo que 4 horas de incubação podem não ser suficientes para ativar todos os mecanismos envolvidos na atividade microbicida e revelar essa diferença. O uso dos antagonistas anti-TLR2 e anti-TLR4 eliminaram a diferença de UFC observada inicialmente entre os grupos PPD+ e PPD-. Essa afirmação pode ser constatada nos

gráficos da figura 6, os quais demonstram que esses anticorpos bloqueadores de TLR influenciaram na atividade microbicida de maneira a anular a diferença entre os grupos PPD- e PPD+, aumentando o número de colônias na presença do antagonista anti-TLR2 e reduzindo a carga bacilar com anti-TLR4, fortalecendo assim nossa hipótese anterior.

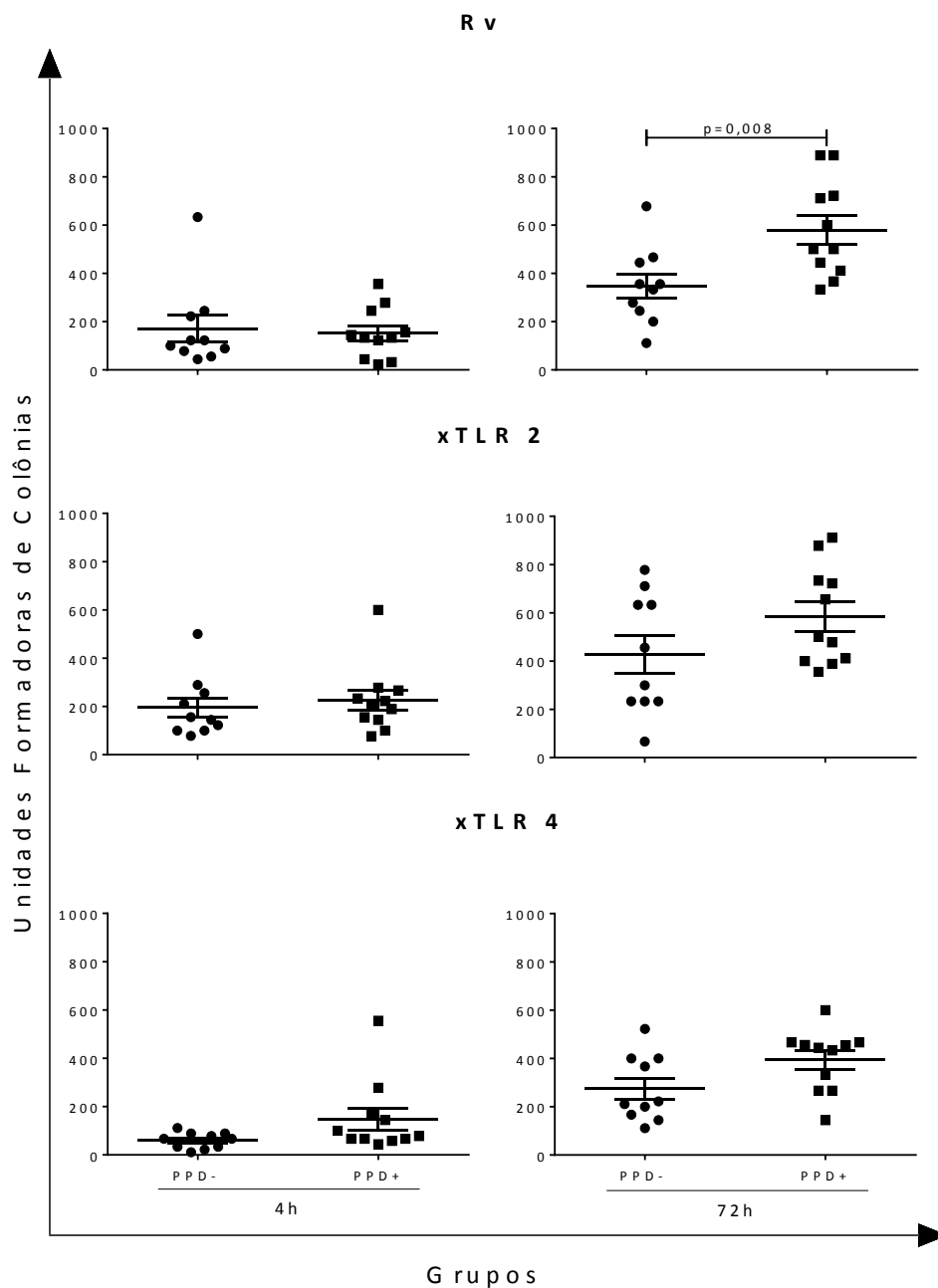


Figura 6: Capacidade microbicida em culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- incubadas por 4 e 72 horas com a cepa H37Rv, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. Os resultados estão expressos em média da concentração bacilar (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado. Foram considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ .



#### **4.4. Análise de correlação entre valor do PPD, frequência de células T reguladoras e capacidade microbicida.**

Os dados referentes à frequência de células T reguladoras e unidades formadoras de colônias demonstraram uma diferença significativa nos perfis de resposta dos grupos estudados. No entanto, observamos uma grande dispersão dos valores dentro dos grupos e hipotetizamos que essas diferenças poderiam estar relacionadas com os resultados distintos do teste intradérmico (PPD) nos participantes do estudo. Considerando que o uso do teste tuberculínico é uma importante ferramenta para estudos da tuberculose latente e que a análise do seu resultado pode servir como base para indicações de tratamento dessa apresentação da doença, decidimos avaliar a correlação entre às diferenças encontradas na frequência de células T reguladoras e unidades formadoras de colônias com o valor do PPD. Na tentativa de melhor compreender a relação do valor do PPD com esses determinantes da resposta imune, optamos por utilizar apenas os dados obtidos pós 72 horas de infecção e sem o uso de antagonistas dos receptores tipo Toll, a fim de representar a resposta imune genuína entre os grupos.

Conforme demonstrado na figura 7, os valores dos pontos de dispersão da frequência de células T reguladoras e valor do PPD apresentam uma trajetória ascendente e proporcional. Para análise da força de associação entre essas variáveis, foi calculado o coeficiente de Spearman, verificando que a presença dessa população de células está correlacionada positiva- e significativamente com o resultado do teste tuberculínico ( $R=0,51$ ). O mesmo ocorreu para a análise do número de unidades formadoras de colônias ( $R=0,43$ ) (figura 8). De acordo com os resultados, observa-se nesse estudo uma correlação moderada entre as variáveis estudadas, sendo esta correlação maior para presença de Tregs com o valor de PPD seguida do UFC. Esse dado sugere que a resposta imune dos grupos estudados, representada pela frequência de Tregs e atividade microbicida é dependente do valor do PPD. Assim, valores elevados do PPD, estão associados a valores elevados de células T reguladoras e carga bacilar.

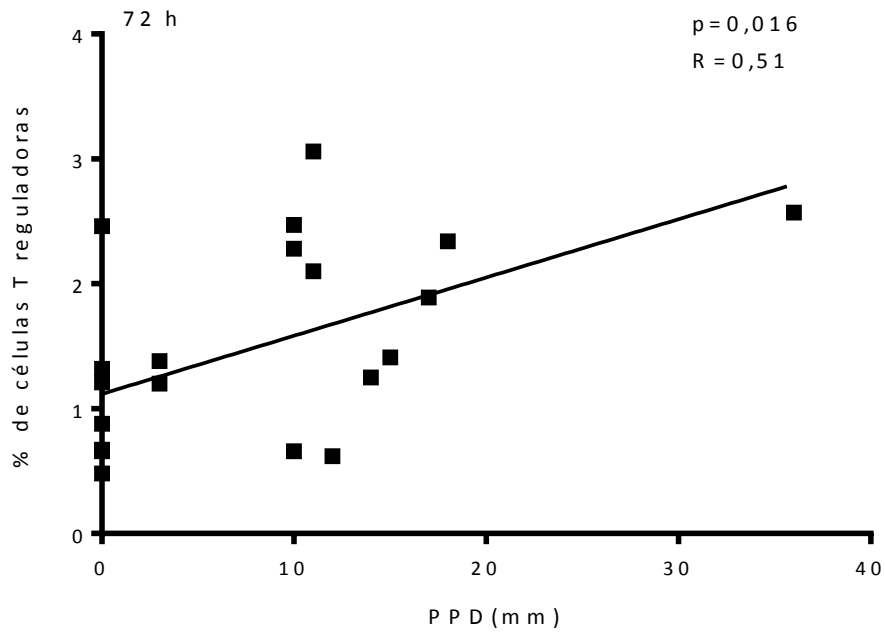


Figura 7: Gráfico de dispersão correspondente aos valores da % de células T reguladoras e do teste tuberculínico (PPD).

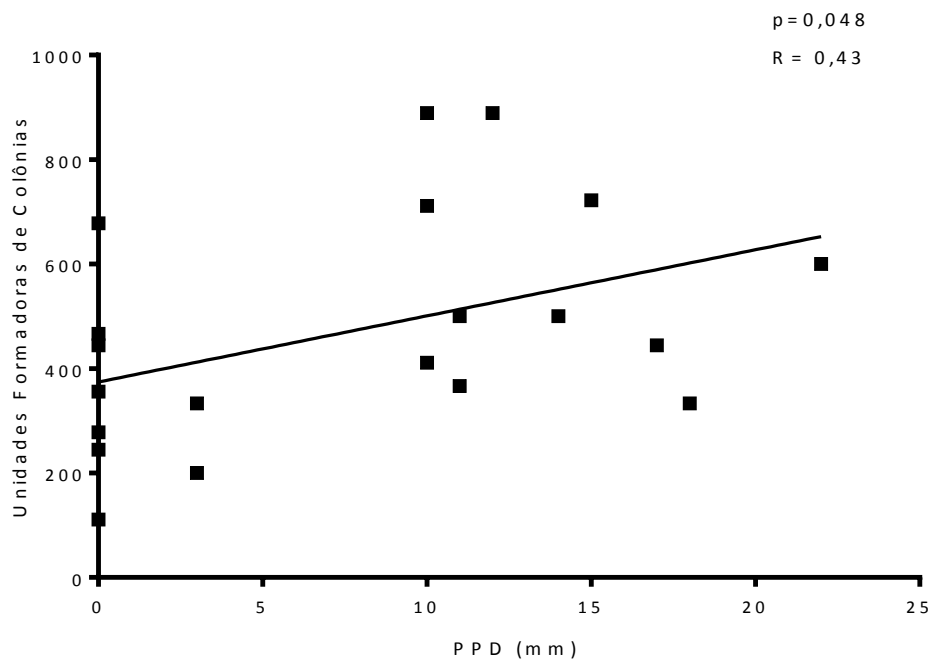


Figura 8: Gráfico de dispersão correspondente aos valores das unidades formadoras de colônias e do teste tuberculínico (PPD).

#### **4.5. Dosagem da produção de óxido nítrico (NO) em culturas de sangue total infectadas com isolados de *M. tuberculosis***

Considerando-se que a participação do óxido nítrico é essencial para eliminar o Mtb, investigamos se a diferença observada entre os grupos em relação à atividade microbicida no tempo de 72 horas poderia estar relacionada com a capacidade de produção do NO. Assim, utilizamos o método de Griess para dosar a concentração de NO nos sobrenadantes dessas culturas (PPD- e PPD+ n=6).

Os dois grupos PPD+ e PPD- apresentaram uma redução significativa na dosagem de NO após estímulo com a cepa H37Rv (figura 9 A). Essa redução pode refletir mecanismos de evasão da bactéria, regulando negativamente esse importante mecanismo da resposta imune presente nos primeiros momentos de contato com o bacilo. A presença dos antagonistas anti-TLR2 e anti-TLR4 não refletiu alterações na concentração de NO nesse tempo de cultura.

Como observado na figura 9 B, a análise entre grupos PPD+ e PPD- não revelou diferenças significativas nos valores dessa dosagem, mas o que podemos perceber é uma tendência a menor produção de óxido nítrico no grupo positivo ao teste tuberculínico.

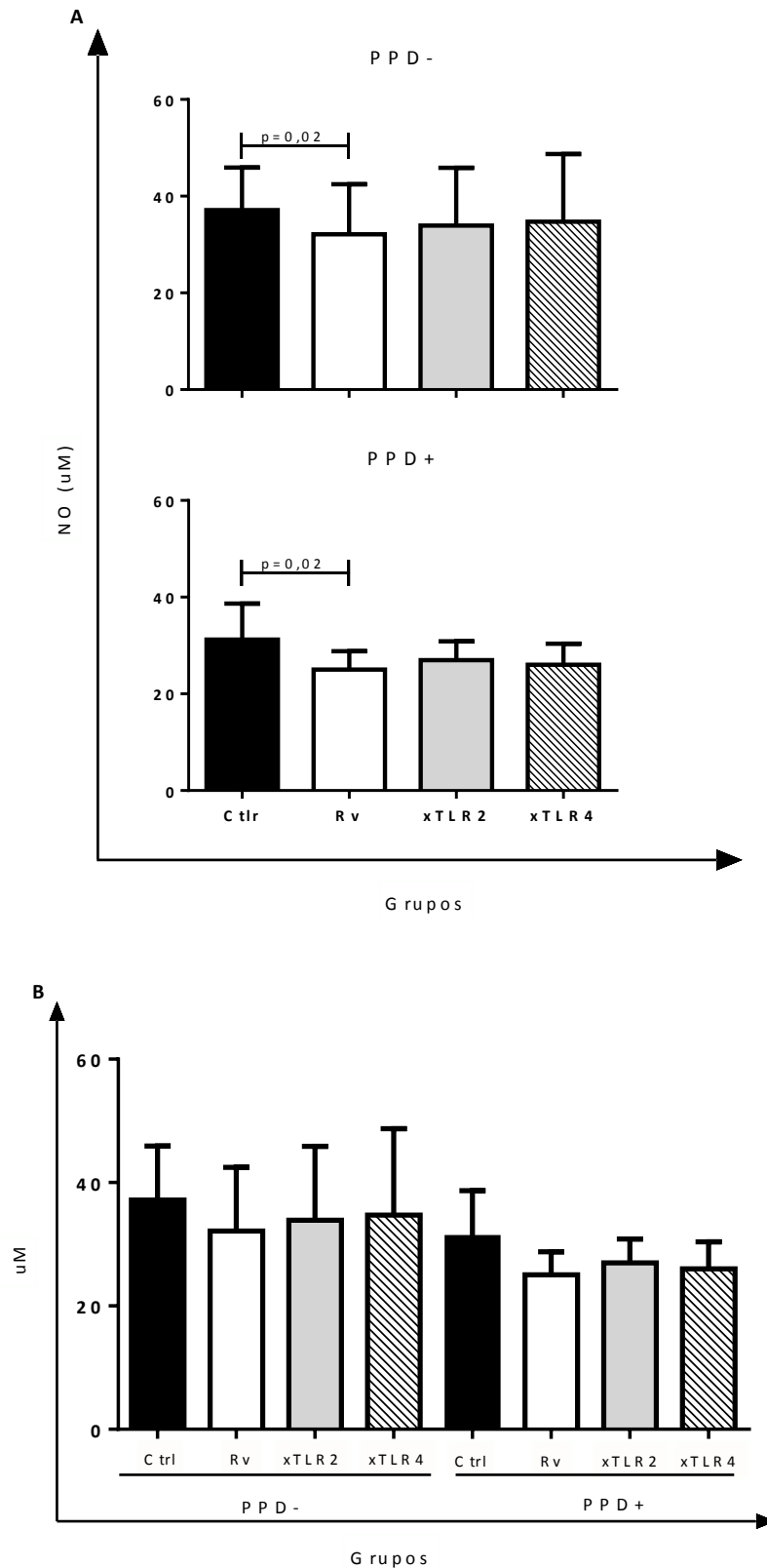


Figura 9: Nível de Óxido nítrico em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração de NO ( $\mu\text{M}$ ) e desvio padrão para cada grupo analisado.

#### **4.6. Perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de sangue total infectadas com os isolados de *M. tuberculosis*.**

A produção de citocinas é determinante para o direcionamento e funcionamento adequado da resposta imune celular. Considerando os dados obtidos inicialmente, buscamos avaliar se a produção destas citocinas poderia estar relacionada com a diferença na frequência de Tregs e atividade microbicida encontrada entre os indivíduos PPD+ e PPD-, e se os receptores TLR2 e TLR4 estão envolvidos ou não na modulação da expressão dessas moléculas. Para isso utilizamos o sobrenadante das culturas de sangue total do ensaio de atividade microbicida, no tempo de 72 horas (PPD- e PPD+ n=10) para quantificação, através do teste Human ELISA Ready-SET-Go! (EBioscience, Inc. California, San Diego, USA), das seguintes citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-4, TGF- $\beta$  e IL-10.

A primeira citocina analisada foi o IFN- $\gamma$ , a qual é crucial para o estabelecimento de uma resposta do tipo Th1, considerada protetora contra o Mtb. Os indivíduos PPD- demonstraram um aumento significativo na expressão dessa citocina após a infecção com a cepa H37Rv (Figura 10 A). O aumento dessa citocina foi observado independente do tratamento (Rv, anti-TLR2, ou anti-TLR4), quando comparados com o controle não infectado. Esse resultado sugere que após a exposição à bactéria, células de indivíduos PPD- são estimuladas a aumentar a produção dessa citocina, e que o bloqueio tanto do receptor TLR2 quanto do TLR4 não interfere na produção de IFN- $\gamma$ , pelo grupo PPD-.

O grupo PPD+ também apresentou um visível aumento na produção do IFN- $\gamma$  quando infectado com a cepa H37Rv, no entanto esse aumento não foi significativo em relação ao controle não infectado. Já a infecção de células pré-tratadas com o antagonista anti-TLR2, levou a um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  em relação ao controle, sugerindo que a neutralização desse receptor durante a infecção com a cepa H37Rv em indivíduos PPD+, modula mecanismos que favorecem a produção dessa citocina.

Por outro lado, o uso do antagonista anti-TLR4 reduziu de maneira significativa a produção de IFN- $\gamma$  em indivíduos PPD+ quando comparada aquela na presença do antagonista anti-TLR2. Isso sugere que pelo menos no modelo utilizado nesse estudo, a neutralização do receptor TLR4, diferentemente do antagonista anti-TLR2, modula mecanismos que impedem o aumento da produção de IFN- $\gamma$ .

A comparação entre os grupos PPD- e PPD+ (figura 10 B) mostrou que células do sangue periférico nesse último grupo apresentam uma capacidade maior em produzir IFN- $\gamma$  quando infectadas pelo Mtb. Esse aumento é significativamente maior mesmo nas amostras do controle não infectado do experimento, sugerindo que endogenamente, esse grupo já apresenta uma maior produção dessa proteína. Após a infecção, o nível dessa citocina permanece significativamente maior no grupo PPD+. Isso é observado onde tanto na presença da cepa H37Rv como também na presença do Mtb e do antagonista anti-TLR2. Esse dado sugere que indivíduos PPD+ apresentam uma maior concentração de células produtoras de IFN- $\gamma$ , e a neutralização do receptor TLR2 visivelmente corrobora com essa produção.

No entanto, a infecção *in vitro* realizada na presença do antagonista anti-TLR4 reduziu essa produção observada nos indivíduos PPD+. A diminuição da produção do IFN- $\gamma$  na presença de anti-TLR4, anulou a diferença encontrada na produção dessa citocina entre os grupos PPD- e PPD+. Dessa forma, sugerimos que, na presença do antagonista anti-TLR4, há uma modulação negativa nos mecanismos responsáveis pela produção do IFN- $\gamma$  no grupo PPD+, tornando os grupos idênticos em relação à produção dessa citocina.

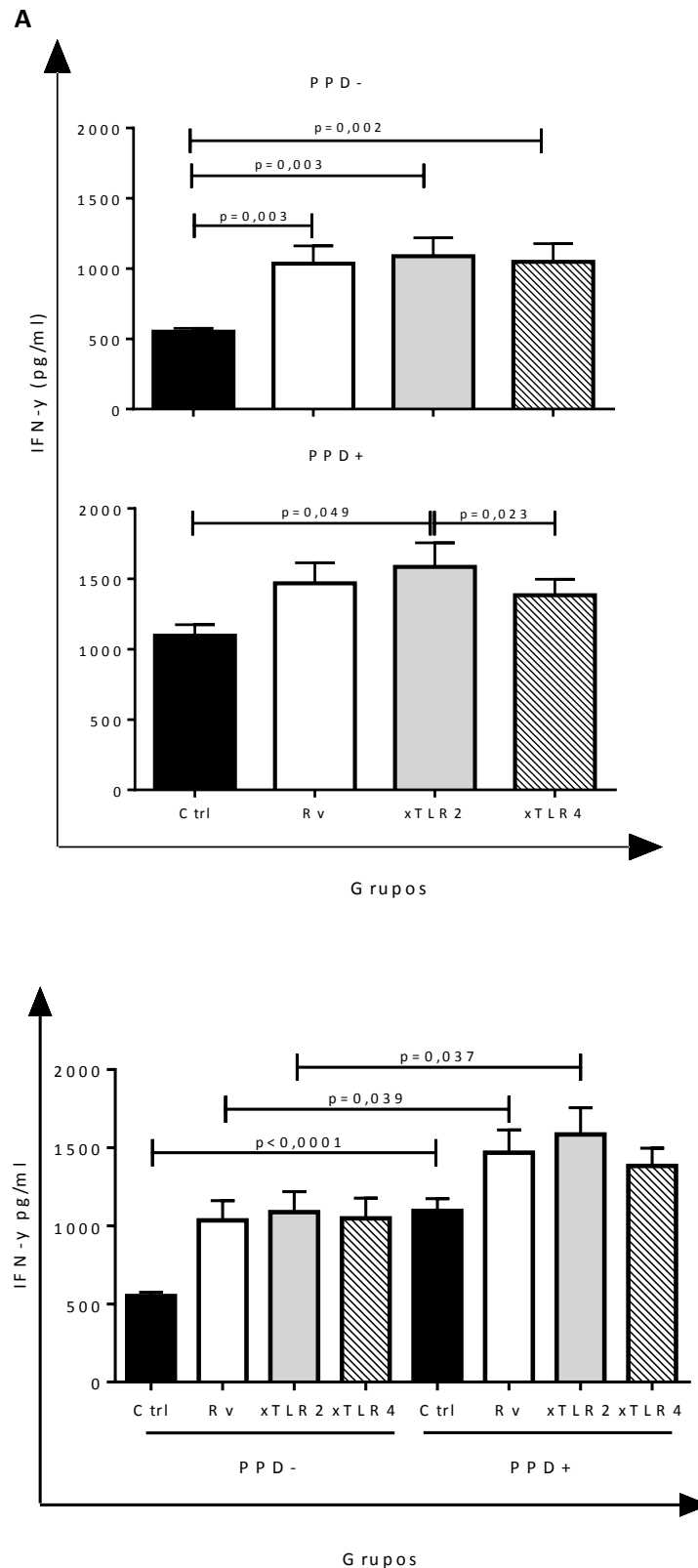


Figura 10: Nível de Interferon gama em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.

Como a produção de IFN- $\gamma$  pode ser afetada pela presença de outras citocinas, analisamos os níveis de IL-4 nas mesmas amostras. Em nosso modelo de estudo essa citocina apresentou baixa expressão e não encontramos diferença estatisticamente significativa nos grupos PPD- e PPD+ em nenhum dos parâmetros analisados, mesmo após a infecção com a cepa e/ou neutralização do TLR2 e TLR4 (figura 11 A). No entanto, quando comparamos os dois grupos, apesar da baixa expressão de IL-4, notamos um aumento significativo da produção dessa citocina por indivíduos PPD-, independente do estímulo/tratamento utilizado, em relação aos PPD+ (figura 11 B). Esse aumento é observado desde o controle não infectado, sugerindo que endogenamente o grupo PPD- apresenta maior produção de IL-4 em relação ao PPD+ e permanece após a infecção, sugerindo que o grupo PPD- durante a infecção com a cepa de Mtb, apresenta uma maior produção de IL-4 do que o PPD+. A infecção na presença de anti-TLR2 e anti-TLR4 não alterou os níveis de produção dessa citocina, permanecendo o grupo PPD- com a expressão de IL-4 significativamente maior em relação ao PPD+.



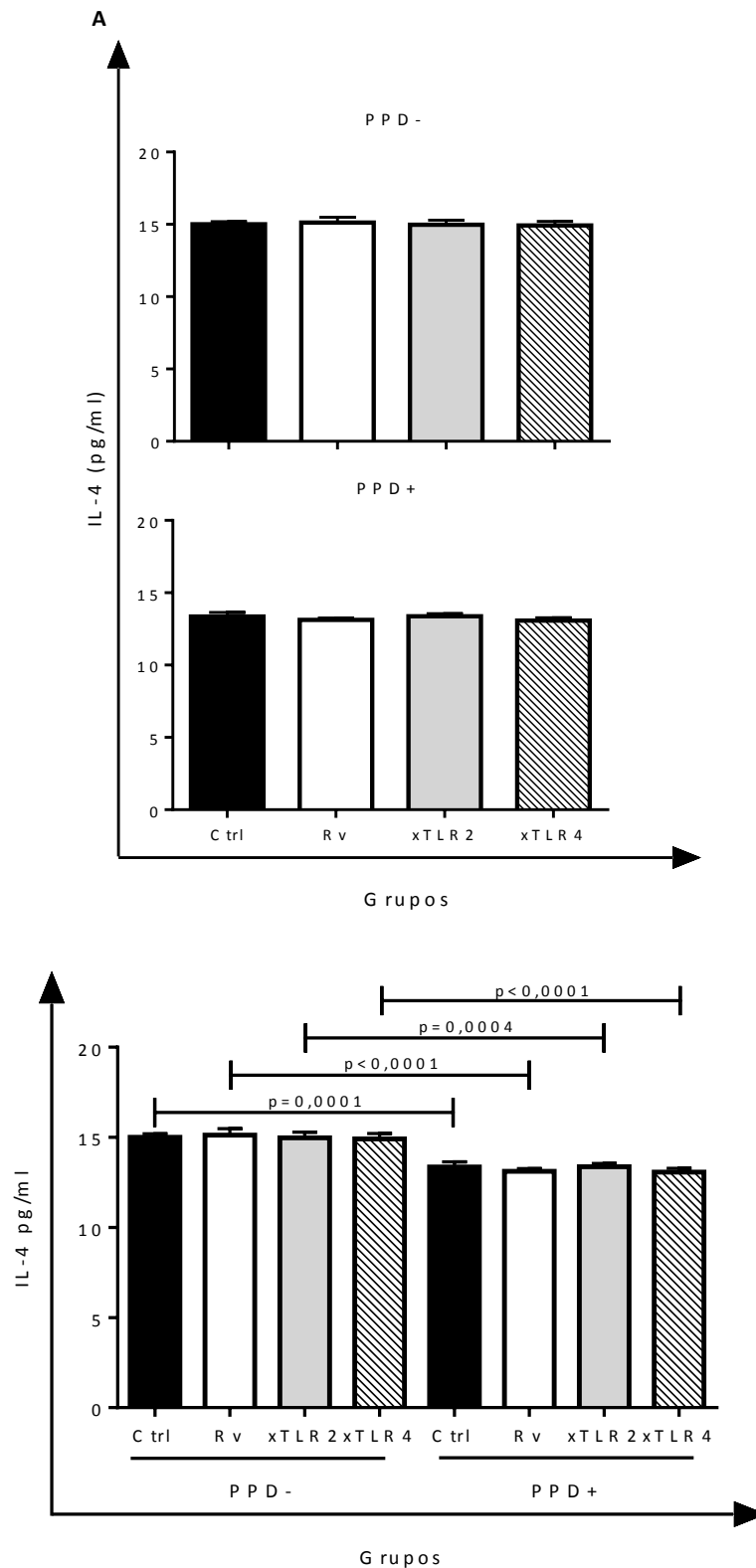


Figura 11: Nível de Interleucina 4 em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.

Outra citocina avaliada foi o TGF- $\beta$ . O grupo PPD- após infecção com a bactéria, apresentou um aumento visível, mas não significativo na produção dessa citocina em relação ao controle não infectado (figura 12 A). Diferentemente, quando a infecção foi realizada na presença dos antagonistas anti-TLR2 ou anti-TLR4, observamos um aumento significativo em relação ao controle não infectado. Esse dado sugere que no grupo PPD- a neutralização dos receptores TLR2 e TLR4 durante a infecção com a cepa H37Rv, modula mecanismos que aumentam a expressão de TGF- $\beta$ .

Observamos também no grupo PPD- uma diferença significativa na produção de TGF- $\beta$ , quando comparamos a infecção somente com a cepa H37Rv e a infecção com a cepa juntamente com o antagonista anti-TLR2. A presença de anti-TLR2 durante a infecção, levou a um aumento na produção de TGF- $\beta$ , em relação à infecção apenas com a cepa H37Rv. Isso corrobora com a hipótese de que a neutralização desse receptor, de alguma maneira, modula positivamente a expressão dessa citocina.

O grupo PPD+ também apresentou essa característica de aumento da expressão de TGF- $\beta$ . Esse aumento foi refletido durante a infecção na presença de anti-TLR2 e anti-TLR4 em relação tanto com infecção apenas com a cepa H37Rv quanto ao controle não infectado. Esse dado fortalece nossa hipótese anterior de que a neutralização dos receptores TLR2 e TLR4 pode modular positivamente a expressão dessa citocina.

A comparação entre os grupos PPD+ e PPD- não revelou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os valores encontrados na dosagem (figura 12 B).

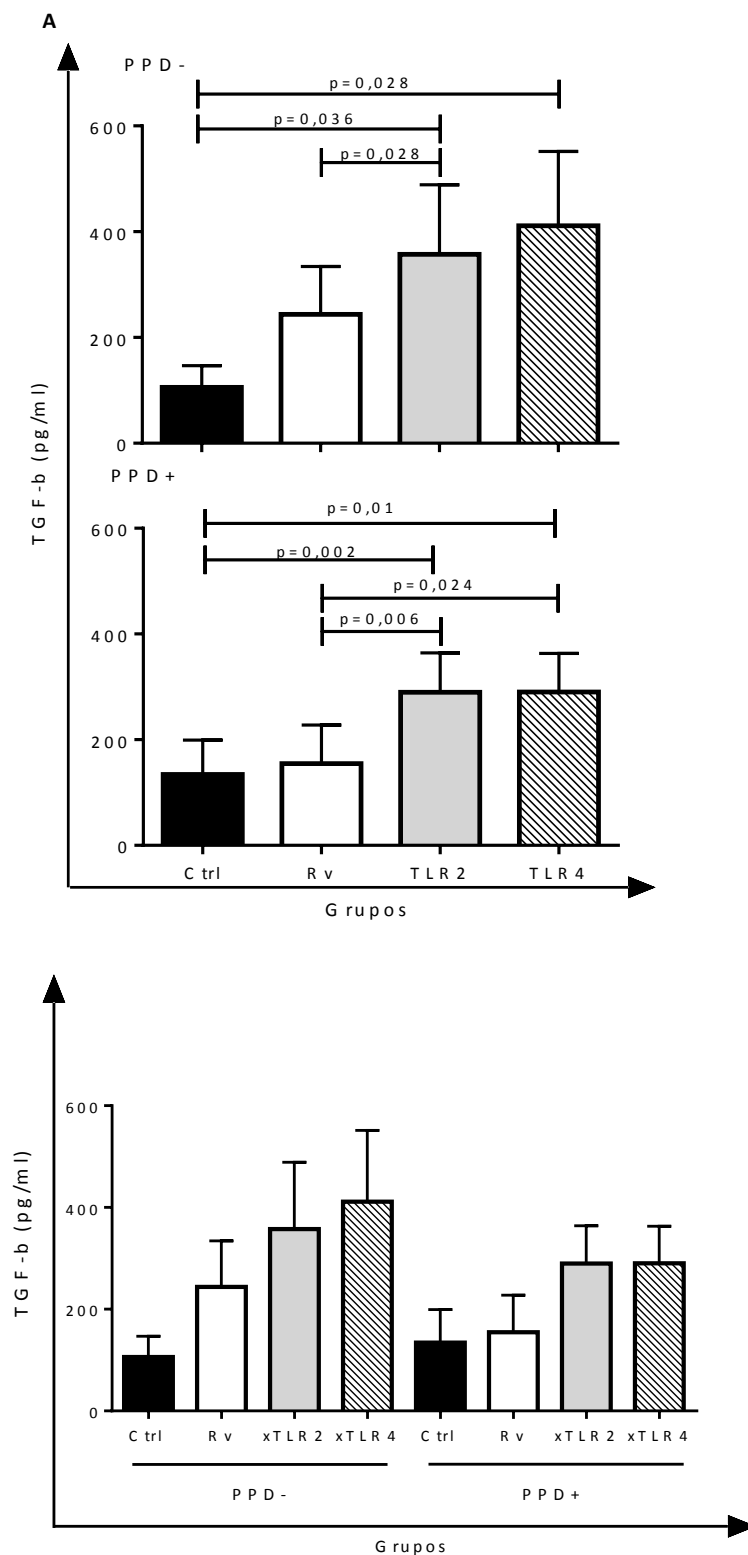


Figura 12: Nível de Fator de transformação do crescimento beta em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.

A última citocina analisada foi a IL-10. Em indivíduos do grupo PPD- a infecção com a cepa H37Rv e também o uso do antagonista anti-TLR2 elevaram significativamente a expressão de IL-10 em relação ao controle não infectado (figura 13 A). Sugerindo que a infecção com a cepa H37Rv e a neutralização do anti-TLR2, aumentam a expressão de IL-10 nesse grupo. Por outro lado, a infecção na presença do antagonista anti-TLR4 reduziu de maneira significativa os níveis de IL-10 encontrado, tornando-os comparáveis ao controle não infectado. Esse achado revela um papel contrário do receptor TLR4 na modulação da produção de IL-10 quando comparado ao TLR2 e sugere que a neutralização do receptor TLR4 modula mecanismos que diminuem a expressão dessa citocina.

No grupo PPD+, observamos que a neutralização do receptor TLR4 permanece com a característica de reduzir os níveis de IL-10 em relação à infecção com a cepa H37Rv e a neutralização do anti-TLR2. A neutralização do receptor TLR4 leva a redução da produção de IL-10 a níveis comparáveis com o controle não infectado, como observado no grupo PPD-, corroborando com nossa hipótese anterior.

A comparação entre os grupos PPD- e PPD+ ressaltou uma capacidade aumentada no grupo PPD- em produzir a IL-10, durante a infecção com a bactéria e o uso do antagonista anti-TLR2 (figura 13 B). No entanto, a presença do antagonista anti-TLR4 durante a infecção, reduziu a produção de IL-10 e anulou a diferença encontrada entre os grupos. A neutralização do receptor TLR4 nos grupos PPD+ e PPD- levou a produção dessa citocina a níveis semelhantes ao controle não infectado. Esses dados, evidenciam um papel contrário dos receptores TLR2 e TLR4 e reforçam a capacidade desses em modular a resposta imunológica, onde para a expressão de IL-10, a neutralização de TLR2 aumenta a produção dessa citocina, e a neutralização de TLR4 reduz essa produção.

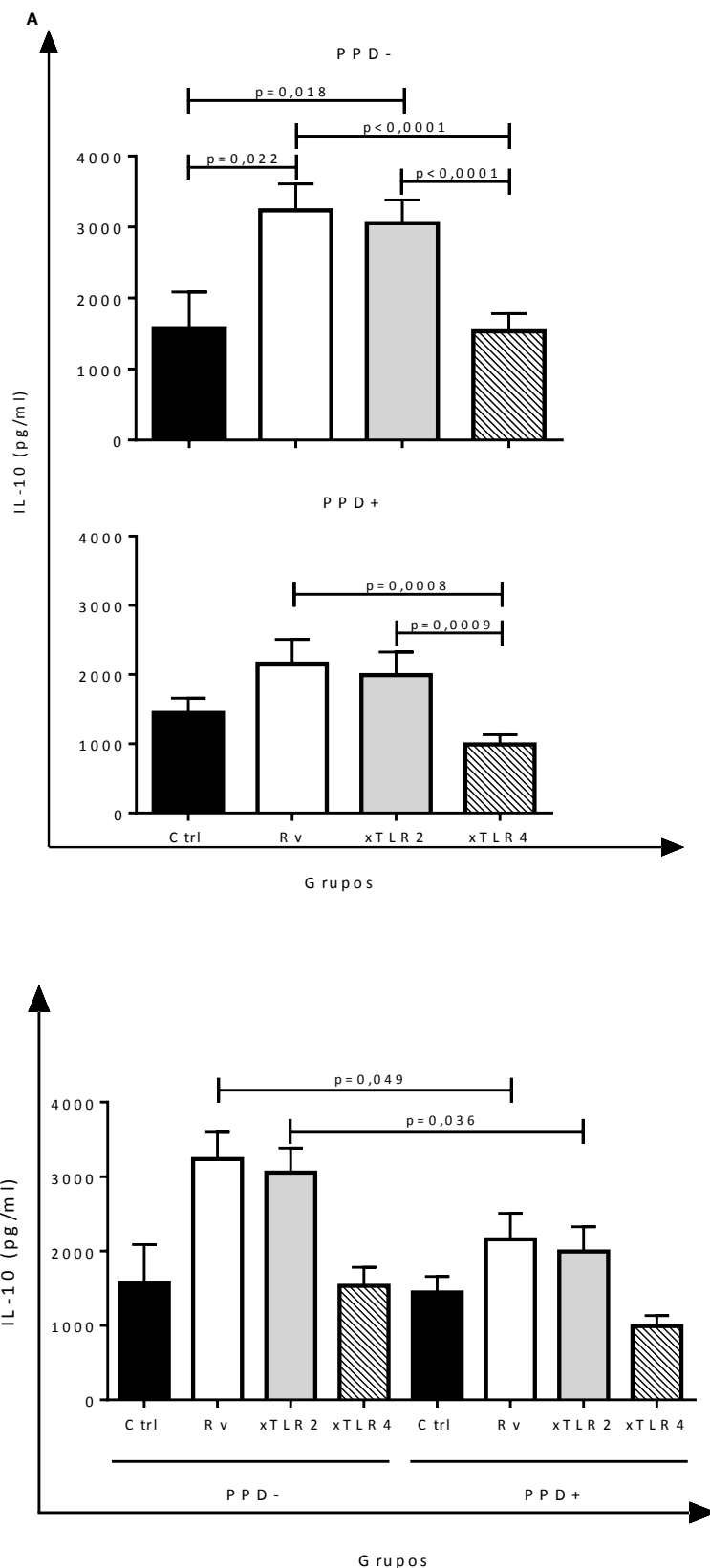


Figura 13: Nível de Interleucina 10 em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 72hs de infecção, na presença ou não de antagonista para o receptor TLR2 ou TLR4. O gráfico A representa a análise intra grupos e o gráfico B representa a análise entre grupos. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.

## **5. Discussão**

A latência é um grande obstáculo para alcançar o controle global da TB, visto que: 1) a pré-exposição ao Mtb pode ser um fator determinante na susceptibilidade à doença; 2) aproximadamente um terço da população mundial está infectada pelo Mtb em sua forma latente (DYE C *et al.*, 1999); e 3) esses indivíduos são potencialmente o maior reservatório da doença, e fonte da transmissão silenciosa da TB para seus contactantes (LING LIN P & FLYNN JL, 2010).

No Brasil, a presença do teste tuberculínico (PPD) positivo, associado à exclusão da tuberculose ativa, caracteriza a presença de infecção latente (CONDE MB *et al.*, 2011). Esse termo foi introduzido em 1907 por Clemens von Pirqueti ao analisar crianças que não manifestavam sintomas da tuberculose, mas apresentavam reação positiva à tuberculina (DANIEL TM, 2006). Recentemente foi sugerido que pacientes PPD+ apresentam uma maior susceptibilidade em desenvolver a doença quando adultos (KORBEL *et al.*, 2008).

Assim, o principal fator para classificação dos indivíduos arrolados em nosso estudo, além daqueles descritos nos critérios de inclusão, foi o resultado do teste tuberculínico (PPD). Os grupos foram divididos de acordo com o resultado da reação desse teste, sendo um grupo caracterizado como reativo (PPD+) e o outro não-reativo, denominado PPD-. Nesse estudo, não levamos em consideração o perfil sócio-epidemiológico dos participantes, dessa forma, como observado na tabela 2, o maior número de mulheres presentes no estudo, não influenciam nos dados obtidos, já que a constituição dos grupos partiu da semelhança entre as respostas obtidas para o PPD. Considerando que características individuais podem ser fatores determinantes de susceptibilidade ou resistência à tuberculose e que a resposta imune desempenha um papel central no controle da replicação do *M. tuberculosis*, a identificação de fatores imunes que diferenciem esses dois grupos de indivíduos é crucial para definir estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes.

A virulência e as características intrínsecas das cepas de Mtb podem influenciar a maneira como as mesmas interagem com o hospedeiro, podendo induzir respostas imunes diferentes (LÓPEZ B *et al.*, 2003; BARCZAK AK *et al.*, 2005). Neste estudo, selecionamos a linhagem virulenta de Mtb, cepa Rv (ATCC H37Rv 27294) adquirida junto à instituição *American Type Culture Collection (EUA)* como cepa padrão em todos os experimentos. A escolha dessa cepa baseou-se no fato da mesma possuir suas características qualitativas devidamente descritas, ser referência de virulência e manter sua estabilidade genética. Além disso, essa cepa apresenta uma capacidade de

evasão do sistema fagocitário de macrófagos alveolares (KEANE J *et al.*, 2001) sendo portanto mais resistente ao ataque do sistema imune e capazes de levar a uma infecção eficiente, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

Dados na literatura utilizando modelos *in vivo* quanto *in vitro*, demonstram o papel importante dos receptores TLR2 e TLR4 no reconhecimento do Mtb e na ativação da resposta imune (BERRINGTON WR & HAWN TR, 2007). O receptor TLR2 é importante por reconhecer lipoproteínas presentes na parede celular do bacilo (YOSHIMURA A *et al.*, 1999), sendo associado ao reconhecimento do Mtb por macrófagos (UNDERHILL DM *et al.*, 1999; BRIGHTBILL HD *et al.*, 1999). A presença de polimorfismo no TLR2 pode provocar uma redução na resposta de macrófagos, levando a uma atenuação da resposta imune contra peptídeos micobacterianos (LORENZ E *et al.*, 2000). Por outro lado, o TLR4 reconhece lipopolissacarídeos (LPS) e tem sido associado à proteção contra o Mtb por sua capacidade em mediar a resposta imune celular específica contra o bacilo (BRANGER J *et al.*, 2004).

Com o objetivo de neutralizar a atividade desses receptores e avaliar seu papel na resposta imune de indivíduos PPD- e PPD+, utilizamos anticorpos monoclonais anti-TLR2 e anti-TLR4 (anti-TLR2, clone TL2.1 ou anti-TLR4, clone HTA125, *IMGENEX*). A especificidade e função desses anticorpos são amplamente conhecida (WANG R *et al.*, 2003; WANG JE *et al.*, 2001). Dessa maneira, baseamos nossa escolha quanto à concentração destes anticorpos antagonistas (5µg/mL) utilizando os dados dos estudos de neutralização de Miettinen e colaboradores (2008) e Lagoumintzis e colaboradores (2007). Considerando que a concentração utilizada pode interferir de maneira dependente na atividade desses receptores, e ainda que a associação simultânea de vários anticorpos para o mesmo receptor pode aumentar o grau de neutralização (UEHORI J *et al.*, 2003), pretendemos em estudos futuros, utilizar uma combinação de anticorpos monoclonais antagonistas para cada um dos TLRs estudados.

A resposta imune celular, em particular aquela mediada por linfócitos T, é crucial para o controle tanto da infecção aguda quanto da crônica provocada pelo Mtb (FLYNN JL & CHAN J, 2001). Nesse contexto, uma população de células T vem sendo amplamente investigada, as células T reguladoras, uma vez que essas células podem suprimir a atividade da maioria das células imunes, através de moléculas secretadas ou expressas em sua superfície (BELKAID Y & TARBELL K, 2009). Diversos estudos comprovaram que as células Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, são ativadas e



expandidas naturalmente *in vivo* durante a exposição a bactérias, protozoários, helmintos e vírus (BELKAID Y *et al.*, 2002; HOUGARDY JM *et al.*, 2007). A função dessas células de limitar a resposta imune tem por objetivo reduzir o dano tecidual causado pela resposta inflamatória; porém, sua expressão excessiva pode impedir/dificultar o controle da infecção, favorecendo a disseminação e multiplicação do patógeno e por conseguinte agravando a doença.

Dados aqui apresentados demonstram que indivíduos PPD+ possuem níveis aumentados de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) no sangue periférico quando comparados a indivíduos do grupo PPD-. Esses resultados corroboram com dados já descritos na literatura relatando o aumento dessas células na TB latente (WERGELAND I & DYRHOL-RIISE AM, 2011; BABU S *et al.*, 2010) e também com dados não publicados de nosso grupo (CAMPANA MCF, 2010; STRINGARI LL, 2012). Outros estudos relatam a presença dessas células em indivíduos PPD+ em modelos diferentes do utilizado por nosso grupo. O trabalho de Garg e colaboradores descreveu a expansão dessa população celular em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos PPD+, o que não ocorria em indivíduos PPD-. De acordo com esses autores essa expansão é dependente de Man-LAM (manose-lipoarabinomanana) e de PGE2 (prostaglandina E2). Considerando-se que Man-LAM é um dos principais constituintes da parede celular do bacilo, seu reconhecimento poderia ser uma via para a indução de células Tregs. (GARG A *et al.*, 2008).

Recentemente, foi descrito o aumento de células T reguladoras no lavado broncoalveolar de indivíduos com TB latente, levantando a hipótese que a exposição ao Mtb pode desencadear uma resposta imune pulmonar específica, seguida por um aumento na frequência de Tregs, na tentativa de prevenir danos teciduais. Esses autores sugerem que o monitoramento de células Tregs pode ser utilizado como biomarcador para progressão da doença ativa e do tratamento da tuberculose (HERZMANN C *et al.*, 2012).

Apesar de podermos relacionar a expansão de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  *in vitro* observada em nosso estudo com a transformação de células  $CD4^+CD25^-$  na periferia, denominadas de iTreg (Tregs induzidas) (HOUGARDY *et al.*, 2007), a rápida proliferação dessas células observada já nas primeiras 4 horas de infecção com a cepa H37Rv pode estar atrelada a uma exposição prévia ao Mtb. Esses dados sugerem que células Treg de memória formadas após a resolução da infecção no primeiro contato com o bacilo nos indivíduos PPD+, poderiam estar sendo ativadas e rapidamente

expandidas durante a segunda infecção, agora *in vitro*. O estudo de Vukmanovic-Stejic e colaboradores (2006) revelou uma proximidade clonal entre células de memória expandidas e células T reguladoras, indicando que elas são provavelmente derivadas a partir de uma rápida divisão de células de memória CD4<sup>+</sup> altamente diferenciadas. A existência dessas células já foi descrita na síndrome mielodisplásica (MAILLOUX AW *et al.*, 2012) e em infecções virais (SANCHEZ AM *et al.*, 2012; BRINCKS EL *et al.*, 2013), porém ainda não foi avaliada durante a tuberculose latente e podem indicar o início de um microambiente imunossupressor, com grande importância para a evolução da doença, mostrando-se um campo importante para futuros estudos.

A presença das Tregs em indivíduos com TB latente pode ser deletéria, pois essa população celular pode regular negativamente as células T antígeno-específicas, reduzir a ativação de macrófagos e, por conseguinte, a eficácia no controle da replicação do bacilo durante um segundo contato ou reativação (KURSAR M *et al.*, 2007; TAAMS LS *et al.*, 2005). Essa função das Tregs já foi demonstrada em pacientes com TB ativa, onde ocorre uma notória expansão dessa população celular e conseqüentemente uma modulação negativa da resposta imune anti-TB por estas células reguladoras. A atividade dessas células é observada principalmente através da supressão de células Th1, evidenciada pela redução nos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos durante exposição ao Mtb (GUYOT-REVOL *et al.*, 2006; RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006, CHEN *et al.*, 2007).

A participação do TLR2 na modulação da função e expansão de Tregs vem sendo descrita em diversos modelos. Apesar da maioria dos estudos utilizarem agonistas de TLR2, ao invés de antagonistas, como em nosso estudo, os dados obtidos são complementares. Nossos dados demonstram que a utilização do antagonista anti-TLR2 leva a uma redução significativa no número de células T reguladoras. Da mesma forma, apesar de inversa, a utilização do agonista de TLR2 denominado PAM3CSK4, levou a um aumento no número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> em ensaios *in vivo* e *in vitro* (SUTMULLER RP *et al.*, 2006; LIU H *et al.*, 2006). Paralelamente, estudos utilizando camundongos nocautes para TLR2 demonstraram que esses animais apresentavam um número significativamente menor de células T reguladoras, corroborando com nossos resultados (SUTMULLER RP *et al.*, 2006). A modulação de células Tregs via TLR2 pode ser por sua ação direta nessas células, uma vez que as mesmas podem expressar diversos tipos de TLR, inclusive o TLR2

(CARAMALHO I *et al.*, 2003). Um provável mecanismo para essa ação do TLR2 em células Tregs pode ser através da regulação da expressão de FOXP3 pelo TLR2 (CRELLIN NK *et al.*, 2005).

Embora o bloqueio de TLR2 possa ter impactado significativamente a frequência de Tregs pós exposição *in vitro* ao Mtb, o uso de antagonistas anti-TLR4 não alterou de maneira significativa, a proliferação de Tregs. No entanto, apesar de não significativa, podemos observar uma redução visível de Tregs com o uso do anti-TLR4. A participação desse receptor na modulação de células T reguladoras é controversa. Dados da literatura evidenciam que o uso de LPS (lipopolissacarídeo), agonista desse receptor, melhora a sobrevivência e proliferação dessas células (JARNICKI AG *et al.*, 2008), bem como sua atividade supressora (WILD CA *et al.*, 2010; CARAMALHO I *et al.*, 2003). No entanto, esse dado não foi confirmado quando o agonista foi utilizado em células Tregs purificadas (KOMAI-KOMA M *et al.*, 2004). Em outros estudos, o bloqueio do receptor TLR4, elevou a frequência de células T reguladoras (ZHANG N *et al.*, 2010), porém, dados do trabalho de Zhai Y e colaboradores (2006), sugerem que a indução e função dessas células são independentes do sinal de TLR4.

Um ponto relevante a ser considerado em relação aos receptores TLR2 e TLR4 e as células T reguladoras é o fato de que o modelo experimental utilizado pode influenciar na resposta obtida. Dessa forma, estudos visando elucidar não só apenas a influência dos TLRs na proliferação das Tregs, mas também em suas funções e mecanismos supressores, se fazem necessários.

Considerando-se que o bloqueio dos receptores TLR2 e TLR4 modula a frequência de células T reguladoras, impedindo o aumento dessa população celular durante a infecção com Mtb; e que dados de outros estudos realizados por nosso grupo associaram a presença elevada dessas células em indivíduos PPD+ com uma redução na atividade microbicida e consequente aumento na concentração bacilar (UFC/mL) (CAMPANA MCF, 2010; STRINGARI LL, 2012). E ainda, considerando o papel importante desses receptores na modulação de Tregs, no reconhecimento do patógeno e no direcionamento da resposta imune durante as infecções, decidimos avaliar o papel dos receptores TLR2 e 4 na atividade microbicida tanto de PPD- quanto de PPD+.

Durante o ensaio da atividade microbicida *in vitro* (whole blood killing assay) observamos que o grupo PPD+ apresentou uma resposta microbicida

significativamente menor quando comparado ao grupo PPD-. Esses dados corroboram achados anteriores do nosso grupo (CAMPANA MCF, 2010; STRINGARI LL, 2012) e levantam uma importante questão sobre a importância da memória imunológica. A definição de memória imunológica se baseia no fato de que a resposta imune contra um determinado antígeno/patógeno é aprimorada e se torna mais vigorosa durante exposição/infecção subsequentes a esse mesmo antígeno/patógeno. Desta forma espera-se que indivíduos expostos/infectados pelo Mtb, aqui representados pelos indivíduos PPD+ deveriam apresentar uma resposta imune celular mais eficaz do que a observada no grupo PPD-, o que não é observado pelos dados obtidos em nosso trabalho. Dados na literatura demonstram uma maior incidência de reinfecções pelo Mtb em pacientes de áreas endêmicas com alta por cura (VERVER S *et al.*, 2005). Paralelamente, foi demonstrado que camundongos vacinados/sensibilizados com BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), apresentam uma resposta Th1 deficitária, quando infectados com o Mtb (JARON B *et al.*, 2008).

Estudos recentes sugerem que a exposição à micobactérias ambientais podem induzir Tregs específicas contra o Mtb, as quais reagem cruzadamente com antígenos presentes na BCG, impedindo que a vacina induza a proteção contra o bacilo (SHAFIANI S *et al.*, 2010; HO P *et al.*, 2010). Esses estudos fornecem evidências de que micobactérias ambientais podem promover a expansão ou recrutamento de Tregs, afetando negativamente a resposta imune. Esses dados suportam nossos resultados, e juntos sugerem que o contato prévio com o Mtb pode induzir uma falha na resposta imune prejudicando a erradicação do bacilo.

Um efeito divergente quanto à participação dos receptores TLR2 e TLR4 foi observado nos experimentos de atividade microbicida. Nossos dados revelaram que a neutralização do receptor TLR2 levou a um aumento na carga bacilar (UFC/mL) e que a neutralização do receptor TLR4 provocou um efeito contrário, uma redução no número de bacilos. Dados na literatura corroboram esse papel distinto dos receptores TLR2 e TLR4 durante infecções. Dados obtidos em estudos utilizando modelo experimental de infecção com baixo número de bacilos BCG demonstraram que camundongos nocautes para TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) não são capazes de controlar eficazmente a proliferação bacilar, exibindo uma deficiência na resposta imune inata e adaptativa. Nesse mesmo modelo experimental, foi demonstrado que o TLR4 apresentava um papel contrário ao do TLR2 durante a infecção. Camundongos nocautes para esse receptor (TLR4<sup>-/-</sup>), apesar de apresentarem uma resposta Th1

reduzida, foram capazes de controlar a proliferação bacilar *in vivo* (HELDWEIN KA *et al.*, 2003), corroborando com nossos achados.

Todavia, dados referentes à função destes receptores na resposta contra patógenos ainda são controversos. Dados de um estudo utilizando modelo experimental de infecção com *Leishmania danovani*, foram contrários aos nossos achados, sendo observado um aumento na proliferação parasitária em animais nocautes para TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) e um menor número de parasitas naqueles nocautes de TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) (MURRAY HW *et al.*, 2013). Estes autores sugerem que o bloqueio de TLR2 pode ser explorado como uma possível estratégia terapêutica para aumentar a atividade anti-*Leishmania* pelos macrófagos (MURRAY HW *et al.*, 2013). Desta forma, acreditamos que fatores tais como o patógeno utilizado e/ou a concentração do inóculo utilizado na infecção podem interferir na modulação da resposta imune via TLR.

Apesar destas controvérsias, dados de vários estudos de infecções micobactérias *in vivo* utilizando animais nocautes mostram claramente que a deficiência do receptor TLR2 modula negativamente a defesa do hospedeiro infectado contra micobactérias, corroborando assim com nossos resultados obtidos *in vitro*. Um aumento na progressão da infecção por micobactérias esta associada à incapacidade dos hospedeiros TLR2<sup>-/-</sup> em controlar a proliferação bacilar (REILING N *et al.*, 2002; SUGAWARA I *et al.*, 2003; GOMES MS *et al.*, 2004; MCBRIDE A *et al.*, 2013). Possíveis mecanismos atribuídos ao aumento da suscetibilidade às micobactérias em hospedeiros TLR2<sup>-/-</sup> são a incapacidade na ativação de mastócitos dependentes de TLR2 (CARLOS D *et al.*, 2009) e a redução da resposta inflamatória provocada pela alteração nos níveis das citocinas IL12p40 (REILING N *et al.*, 2002; GOMES MS *et al.*, 2004; DRENNAN MB *et al.*, 2004), TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (DRENNAN MB *et al.*, 2004).

Dados obtidos durante a infecção pelo Mtb *in vivo* utilizando-se camundongos deficientes para o receptor TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) são controversos. Alguns estudos demonstraram que a participação do TLR4 é importante para o controle da infecção e proteção contra o bacilo (ABEL B *et al.*, 2002; BRANGER J *et al.*, 2004). Por outro lado, outros autores mostraram que animais com deficiência de TLR4 também apresentavam resistência contra a infecção pelo Mtb (REILING N *et al.*, 2002; KAMATH AB *et al.*, 2003). Sugerindo que a ativação/presença do TLR4 não é

crucial para o controle da infecção pelo bacilo. Essa hipótese é suportada por dados de Fremond e colaboradores os quais sugerem alguns mecanismos que podem estar envolvidos no controle da infecção pelo Mtb em hospedeiros TLR4<sup>-/-</sup>. Esses autores demonstraram que a deficiência de TLR4 não afetou o recrutamento de células inflamatórias, nem a ativação de fagócitos e assim como a formação do granuloma. Além disso, estes autores sugerem que pode haver um aumento na produção de IL-12p40 em hospedeiros com TLR4<sup>-/-</sup>, a qual pode contribuir com IL-12 e/ou IL-23 promovendo o aumento da resposta inflamatória (FREMOND *et al.*, 2003) e por conseguinte o controle da infecção. No entanto, em modelos experimentais utilizando outros patógenos, a deficiência no receptor TLR4 foi associada com a redução da IL-12 (OBONYO M *et al.*, 2007).

Portanto, baseando-nos em nossos dados e nos dados de outros autores, acreditamos que o reconhecimento do Mtb pelo receptor TLR2, contribui para o estabelecimento de uma resposta imune adequada, associada com a defesa do hospedeiro contra a infecção. Palma C e colaboradores descreveram o aumento da atividade microbicida mediada por ligantes de TLRs, principalmente, ligantes de TLR2, sugerindo que a modulação da atividade dos receptores Toll são alvos em potencial para desenvolvimento de drogas anti-Mtb (PALMA C *et al.*, 2009). Por outro lado, nossos dados mostram que neutralização do receptor TLR4 reduziu a carga bacilar em ambos os grupos estudados (PPD<sup>+</sup> e PPD<sup>-</sup>), sugerimos assim, que o ativação e a sinalização através desse receptor podem ser uma via de escape utilizado pelo Mtb para regular negativamente a resposta imune do hospedeiro.

Para investigarmos essa hipótese, dosamos os níveis de óxido nítrico e das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, TGF- $\beta$  e IL-10 em sobrenadante de culturas de sangue total de indivíduos PPD<sup>-</sup> e PPD<sup>+</sup>. O bloqueio utilizando antagonistas dos receptores TLR2 e TLR4 não influenciou na concentração de NO nos sobrenadantes avaliados. Porém, observamos uma redução significativa na produção de óxido nítrico na presença da cepa H37Rv. Essa redução pode estar atrelada aos mecanismos de evasão do bacilo. Sabe-se que o Mtb pode ativar os receptores PPAR- $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) que estão associados à ativação de macrófagos do tipo M2 (M $\Phi$ -M2) (RAJARAM *et al.*, 2010). Uma vez ativados, M $\Phi$ -M2 passariam a estimular a produção de IL-8, IL-10, COX2 e PGE2, que atuariam na inibição da produção de óxido nítrico, tornando assim o ambiente favorável à sobrevivência/replicação do bacilo dentro da célula (ALMEIDA, A. S. *et al.*, 2009).

Também podemos associar essa diminuição ao aumento na presença das células Tregs, pois elas contribuem para esta mudança fenotípica, uma vez que estimulam produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , que por sua vez amplificam a resposta Th2 e estimulam o fenótipo M2 dos M $\Phi$  (LIU *et al.*, 2011).

Apesar de não observarmos diferença significativa na produção de NO entre os grupos PPD- e PPD+, encontramos uma tendência à diminuição na produção de NO nos grupos PPD+. Esse dado sugere uma possível associação entre a redução da produção de NO com a atividade microbicida apresentada pelo grupo PPD+. Estudos em modelos murinos revelam que a presença de NO é fundamental para a proteção do hospedeiro contra o Mtb (MACMICKING JD *et al.*, 1997). Além disso, a falha em expressar a enzima iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) resulta em maior suscetibilidade a TB, aumento na proliferação do bacilo (CHAN J *et al.*, 1995) e reativação da TB latente devido ao tratamento com inibidores dessa enzima (FLYNN JL *et al.*, 1998). A ausência de diferenças significativas na dosagem de NO entre os grupos estudados podem ter sido causada pelo número reduzido de amostras avaliadas (n=6/grupo).

Por outro lado, os níveis de IFN- $\gamma$  apresentaram-se mais elevados no grupo PPD+ quando comparados ao grupo PPD-. Dados de outros autores sugerem que o aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  em indivíduos com TB latente (PPD+) podem estar relacionados ao não desenvolvimento da TB ativa (GUIO H *et al.*, 2010; LIN PL & FLYNN JL; 2010). Apesar do aumento na produção de IFN- $\gamma$  ter sido associado à proteção contra micobactérias (CASTILLO-RODAL AI *et al.*, 2006), a presença dessa citocina por si só não representa um fator de proteção. Dados obtidos em modelos experimentais murinos de TB latente, mostrou que a depleção de linfócitos CD4+, mesmo na presença de IFN- $\gamma$  e da enzima iNOS, levava a uma rápida reativação da doença (SCANGA CA *et al.*, 2000).

Apesar do grupo PPD+ ter apresentado níveis elevados de IFN- $\gamma$ , o grupo PPD- também apresentou um aumento na produção dessa citocina. Esse aumento na produção de IFN- $\gamma$  no grupo PPD- coincide com a tendência na elevação da concentração de NO e com a maior atividade microbicida observada nesse grupo. Assim, a ativação de linfócitos T CD4+ de indivíduos PPD- pelo Mtb pode induzir a produção de IFN- $\gamma$  e conseqüentemente ativar macrófagos a produzirem óxido nítrico, aumentando assim a destruição das micobactérias fagocitadas.

O uso do antagonista anti-TLR2 foi associado a um aumento na concentração de IFN- $\gamma$ , o que pode estar correlacionado à redução no número de células T reguladoras. Porém, apesar do aumento dessa citocina e da diminuição na frequência de Tregs, o bloqueio do receptor TLR2 foi associado a um aumento na carga bacilar no grupo PPD+. Por outro lado, apesar do uso do antagonista anti-TLR4 reduzir a concentração de IFN- $\gamma$ , em contrapartida sua utilização também reduziu a carga bacilar. Esses dados corroboram com dados da literatura, onde somente a presença de IFN- $\gamma$  não é um fator de proteção para a infecção com Mtb (SCANGA CA *et al.*, 2000).

A quantificação de IL-4 revelou baixos níveis dessa citocina nos sobrenadantes de culturas tanto de indivíduos PPD- quanto de PPD+. A produção de IL-4 não sofreu alteração com o uso dos antagonistas anti-TLR2 e anti-TLR4. Todavia os níveis de IL-4 no grupo PPD- foram significativamente maiores do que aqueles observados em indivíduos PPD+. Apesar da presença dessa citocina estar atrelada ao desenvolvimento de uma resposta Th2, a qual pode ser prejudicial ao desenvolvimento de uma resposta protetora ao Mtb (LIENHARDT C *et al.*, 2002), o aumento nos níveis de IL-4 no grupo PPD- não influenciou na atividade microbicida desse grupo. Em contrapartida, a redução na produção de IL-4 era esperada no grupo PPD+, visto que indivíduos que controlam a TB latente apresentam um aumento nos níveis de IL-4 $\delta$ , citocina antagonista natural do IL-4, (DEMISSIE A *et al.*, 2004).

A comparação dos níveis de TGF- $\beta$ , não revelou diferença entre os grupos PPD- e PPD+, apesar do grupo PPD+ apresentar uma elevação na frequência de células Tregs. Dessa forma, sugerimos que os mecanismos imunorreguladores utilizados pelas células T reguladoras, nesse modelo, são independentes de TGF- $\beta$ . Um fato que corrobora com essa hipótese é que o uso dos antagonistas anti-TLR2 e anti-TLR4 apesar de reduzirem o número de Tregs, elevaram os níveis dessa citocina tanto nos indivíduos PPD- como no grupo PPD+. No entanto, embora muitas vezes o aumento de TGF- $\beta$  possa ser associado a mecanismos imunossupressores, durante nossos experimentos, o aumento dessa citocina, foi associado a redução na carga bacilar quando utilizamos o antagonista anti-TLR4. A respeito dessa questão, vale lembrar que a presença de TGF- $\beta$  pode também estar relacionada com a diferenciação de células Th17 (ANNUNZIATO F *et al.*, 2007) e que essas células estão envolvidas com uma resposta protetora contra o Mtb (KHADER SA *et al.*, 2007; CURTIS MM & WAY SS, 2009).



A última citocina analisada foi a IL-10. Na comparação entre grupos, observamos um aumento significativo dessa citocina no grupo PPD- em relação ao grupo PPD+. Assim, como para o TGF- $\beta$ , sugerimos que a produção de IL-10 não é um dos mecanismos reguladores utilizado pelas Tregs nesse modelo. Um fato que nos chamou muito a atenção quanto aos níveis de IL-10, foi durante o uso do antagonista anti-TLR4. Observamos que a infecção com a cepa de Mtb na presença do antagonista anti-TLR4 reduziu a produção de IL-10 a níveis semelhantes aos observados para os controles não infectados. Esse resultado sugere a existência de uma importante correlação entre a redução dos níveis de IL-10 e uma maior atividade microbicida, como observada com o uso do antagonista anti-TLR4. Desta forma, acreditamos que o Mtb possa utilizar da ativação via TLR4 para suprimir/diminuir a resposta imune, favorecendo a instalação da latência da infecção. Dados da literatura corroboram nossa hipótese. De acordo com Obonyo M e colaboradores a bactéria *Helicobacter pylori* pode utilizar o receptor TLR4 para suprimir a resposta imune e que durante infecções por esse patógeno, ocorre uma dependência parcial desse receptor para a produção de IL-10 (OBONYO M *et al.*, 2007).

A correlação entre a ativação do receptor TLR4 e a produção de IL-10 foi mostrada em diversos estudos (YANAGAWA Y & ONOÉ K, 2007; LIU CY *et al.*, 2013; BELDERBOS ME *et al.*, 2011). Vários autores relatam que o aumento de IL-10 prejudica a resposta imune e que a redução nos níveis dessa citocina contribui para a eliminação do patógeno durante infecções por *Leishmania major* (KANE MM & MOSSER DM, 2001) e por *Candida albicans* (VAZQUEZ-TORRES A *et al.*, 1999). Resultados similares foram descritos para Mtb, onde em modelos experimentais de infecção na ausência de IL-10 (fruto tanto do bloqueio quanto da infecção de animais nocautes), foi observado um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e uma menor carga bacilar (REDFORD PS *et al.*, 2010; DENIS M & GHADIRIAN E, 1993; BEAMER GL *et al.*, 2008). Somados esses dados fortalecem nossa hipótese de que a ativação via TLR4 pode estar envolvida com o aumento na produção de IL-10. Considerando-se que a presença dessa citocina pode ser prejudicial para o estabelecimento da resposta imune adequada contra o Mtb, sugerimos que a manipulação dessa via TLR4/IL-10 possa ser uma importante ferramenta para novas estratégias no tratamento anti-TB.

A fim de melhor entendermos os mecanismos envolvidos com a atividade dos receptores TLR2 e TLR4 durante o controle da infecção e do crescimento bacilar,

pretendemos futuramente, investigar a nível molecular os fenômenos observados em nosso estudo, ampliando as citocinas a serem analisadas, inserindo fatores de transcrição, analisando a função e frequência de outras populações celulares, e avaliando a existência de diferenças na capacidade fagocitária durante a atividade microbicida.

Por fim, observamos que tanto a frequência de células T reguladoras quanto à atividade microbicida são mecanismos imunológicos capazes de diferenciar os grupos estudados, PPD- e PPD+. Além disso, essas variáveis estão correlacionadas positivamente com o valor do teste tuberculínico, como demonstrado por Wergeland I e colaboradores (2010). Dessa forma, sugerimos que a frequência de Tregs, a atividade microbicida e os receptores TLR2 e TLR4 podem influenciar no desenvolvimento da infecção micobacteriana e estão relacionados com a eliminação do bacilo, o fenótipo de latência e a tuberculose ativa.

Estudos futuros estão programados para avaliar o potencial da utilização destas variáveis como marcadores alternativos para a progressão/reativação da TB latente, bem como para a verificação do sucesso da quimioprofilaxia em indivíduos PPD+.

## **6. Conclusão**

Nossos dados demonstram que:

1. A frequência células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> foi significativamente maior entre indivíduos PPD+ quando comparados a PPD-. Além disso, o tratamento com antagonista de TLR2 implica na redução da frequência desta população.
2. A capacidade microbicida dos indivíduos PPD+ em culturas de sangue total foi significativamente menor quando comparada ao grupo PPD-. Além disso, o tratamento com antagonista de TLR2 leva ao aumento da carga bacilar nos grupos avaliados, diferentemente do observado no tratamento com o antagonista de TLR4, o qual gera uma significativa redução no número de bacilos, tanto no grupo PPD- quanto no grupo PPD+.
3. Os antagonistas de TLR2 e TLR4 modulam diferentemente a produção de citocinas e conseqüentemente a resposta imune entre indivíduos PPD- e PPD+. Essa atividade distinta dos receptores TLR2 e TLR4 fica ainda mais evidente na modulação da produção de IL-10, onde o uso de antagonista para TLR4 reduz de maneira significativa a produção dessa citocina, o que pode estar relacionado com o aumento na atividade microbicida observada em nosso estudo.
4. O grupo PPD- apresentou uma tendência para maior produção de NO, o que pode estar relacionado com a melhor atividade microbicida apresentada por esse grupo. O uso dos antagonistas de TLR2 e TLR4 não alterou a produção de NO durante a infecção *in vitro* com Mtb.

#### **Conclusão final:**

A frequência de Tregs, a atividade microbicida e o reconhecimento do Mtb pelos receptores TLR2 e TLR4 podem influenciar no desenvolvimento da infecção micobacteriana e estão relacionados com a eliminação do bacilo, o fenótipo de latência e a tuberculose ativa. Nesse contexto, medicamentos ou produtos imunobiológicos que potencializem ou neutralizem a ativação desses receptores poderão ser futuros alvos para o tratamento anti-TB e quimioprofilaxia da TB latente.

## **7. Referências**

ABEL, B. et al. Toll-Like Receptor 4 Expression Is Required to Control Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 3155–3162, 2002.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

ALMEIDA, A. S. et al. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 718–731, 2009.

ANNUNZIATO, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 1849–1861, 2007.

ARAUJO, Z. et al. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de Mycobacterium tuberculosis en la protección, patología y diagnóstico. **Investigación Clínica**, v. 49, n. 3, p. 411-441, 2008.

BABU, S. et al. Regulatory T Cells Modulate Th17 Responses in Tuberculin skin test positive (TST+) individuals. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 1, p. 20–31, 2010.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 1715–1724, 2005.

BARCZAK, A. K. et al. In vivo phenotypic dominance in mouse mixed infections with Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 600–606, 2005.

BEAMER, G. L. et al. Interleukin-10 promotes Mycobacterium tuberculosis disease progression in CBA/J mice. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 5545–5550, 2008.

BELDERBOS, M. E. et al. Low neonatal Toll-like receptor 4-mediated interleukin-10 production is associated with subsequent atopic dermatitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, p. 66–75, jan 2012.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism interactions. **Annual Reviews Immunology**, v. 27, p. 551–589, 2009.

BERRINGTON, W. R.; HAWN, T. R. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? **Immunological Reviews**, v. 219, p. 167–186, 2007.

BRANGER, J. et al. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice. **International Immunology**, v. 16, p. 509–516, 2004.

BRIGHENTI SUSANNA AND MARIA LERM (2012). How Mycobacterium tuberculosis Manipulates Innate and Adaptive Immunity – New Views of an Old Topic, Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity, Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), ISBN: 978-953-307-942-4, **InTech**, DOI: 10.5772/29651. Available from: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-analyzing-the-origin-of-mycobacterium-tuberculosis-pathogenicity/how-mycobacterium-tuberculosis-manipulates-innate-and-adaptive-immunity-new-views-of-an-old-topic>

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, p. 732–736, 1999.

BRINCKS, E. L. et al. Antigen-Specific Memory Regulatory CD4+Foxp3+ T Cells Control Memory Responses to Influenza Virus Infection. **The Journal of Immunology**, 2013.

BULUT, Y. et al. Mycobacterium Tuberculosis Heat Shock Proteins Use Diverse Toll-like Receptor Pathways to Activate Pro-inflammatory Signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 20961–20967, 2005.

CAMPANA, M. C. F. Avaliação do impacto da presença de células T reguladoras na resposta imune contra o *Mycobacterium tuberculosis* em indivíduos PPD+ e PPD-. **Vitória: Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas - Universidade Federal do Espírito Santo - UFES**, p. 107, 2010.

CARAMALHO, I. et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 4, p. 403-411, 2003.

CARLOS, D. et al. TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbes and infection Institut Pasteur**, v. 11, p. 770–778, 2009.

CASTILLO-RODAL A. I. et al. *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 76, p.1718–1724, 2006.

CAWS, M. et al. The Influence of Host and Bacterial Genotype on the Development of Disseminated Disease with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 9, 2008.

CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROLL, D.; FLYNN, J.; BLOOM, B. R. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v.63, p.736-40, 1995.

CHEN X. et al. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. **Clinical Immunology**, v. 123, n. 1, p. 50-59, 2007.

COFFMAN R. L.; ROMAGNANI S. *Redirection of Th1 and Th2 Responses*, Springer, Berlin, Germany, 1999.

CONDE, M. B. et al. Tuberculose Infecção Latente: Diagnóstico. **Diretrizes Clínicas na Saúde Suplementar**, p 1-14, 2011.

CRELLIN, N. K. et al. Human CD4<sup>+</sup> T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 8051–8059, 2005.

CURTIS, M. M.; WAY, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, p. 177–85, 2009.



DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–70, 2006.

DANNENBERG, A. M. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 28, p. 51-58, 1993.

DAVILA, S. et al. Genetic Association and Expression Studies Indicate a Role of Toll-Like Receptor 8 in Pulmonary Tuberculosis. **PLoS Genetics**, v. 4, p. e1000218, 2008.

DEMISSIE, A. et al. Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 6938–6943, 2004.

DENIS M.; GHADIRIAN E. IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic *Mycobacterium avium* infections. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 10, p. 5425- 5430, nov 1993.

DOHERTY, T. M.; ANDERSEN, P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 687-692, 2005.

DOHERTY, T. M.; ARDITI, M. TB , or not TB : that is the question — does TLR signaling hold the answer ? **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1699-1703, 2004.

DRENNAN, M. B. et al. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p. 49–57, 2004.

DYE, C. et al. Global burden of tuberculosis: estimate incidence, prevalence and mortality by country. **The Journal of the American Medical Association**, v. 282, p. 677-686, 1999.

FLYNN, J. L. et al. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 1796–1803, 1998.

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

FREMOND, C. M. C. et al. Control of *Mycobacterium bovis* BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice. **Microbes and Infection Institut Pasteur**, v. 5, p. 1070–1081, 2003.

FREMOND, C. M. et al. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1790–1799, 2004.

GARG, A. et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Europe Journal of Immunology**, v. 38, n. 2, p. 459-469, 2008.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 7–17, 2003.

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

GIDEON, H. P.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: what the host “sees”?. **Immunologic Research**, v. 50, n. 2-3, p. 202–12, 2011.

GOMES, M. S. et al. Limited role of the Toll-like receptor-2 in resistance to *Mycobacterium avium*. **Immunology**, v. 111, p. 179–185, 2004.

GUIO, H. et al. High numbers of interferon-gamma-producing T cells and low titers of anti-tuberculous glycolipid antibody in individuals with latent tuberculosis. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 220, p. 21–25, 2010.

GUYOT-REVOL, V. et al. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 7, p. 803–10, 2006.

HARRIS, J. et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunity**, v. 27, p. 505–517, 2007.

HELDWEIN, K. A. et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, p. 277–286, 2003.

HERZMANN, C. et al. Increased frequencies of pulmonary Treg cells in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The European Respiratory Journal**, v. 40, n. 6, p. 1450-1457, 2012.

HO, P.; WEI, X.; SEAH, G. T. Regulatory T cells induced by *Mycobacterium chelonae* sensitization influence murine responses to bacille Calmette-Guerin. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 1073–1080, 2010.

HOPEWELL, P. C. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology clinical features, management, and control of tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 540-547, 1992.

HOUGARDY, J.-M. et al. In vitro expansion of D4+CD25highFOXP3+CD127low/- regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy *Mycobacterium tuberculosis*-infected humans. **Microbes and Infection Institut Pasteur**, v. 9, p. 1325–1332, 2007.

IDH, J. et al. Nitric oxide production in the exhaled air of patients with pulmonary tuberculosis in relation to HIV co-infection. **Biomed Central Infection Diseases**, v. 8, p. 146, 2008.

JARNICKI, A. G. et al. Attenuating Regulatory T Cell Induction by TLR Agonists through Inhibition of p38 MAPK Signaling in Dendritic Cells Enhances Their Efficacy as Vaccine Adjuvants and Cancer Immunotherapeutics. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 3797 – 3806, 2008.

JARON, B. et al. Effect of Attenuation of Treg during BCG Immunization on Anti-Mycobacterial Th1 Responses and Protection against *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 3, p. 10, 2008.

JONES, B. W. et al. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. **Diseases**, v. 60 Suppl 3, p. iii6–i12, 2001.

KAMATH, A. B. et al. Toll-Like Receptor 4-Defective C3H/HeJ Mice Are Not More Susceptible than Other C3H Substrains to Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4112–4118, 2003.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 1141–1147, 2001.

KANG, D. D. et al. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. **PLoS one**, v. 6, n. 1, p. e16161, 2011.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 984–993, 2003.

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

KAUFMANN, S.H. Gama/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2272-2279, 1996.

KAUFMANN, S.H.E.; WINAU, F. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1063–1066, 2005.

KEANE, J.; GERSHON, S.; WISE, R. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 15, p. 1098-1104, 2001.

KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nature Immunology**, v. 8, p. 369–377, 2007.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, 2011.

KOCH, R. Die aetiologie der Tuberculose (Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24.März cr. gehaltenem Vortrage). **Berliner Klin Wochenschr**, v. 19, p. 221–230, 1882.

KOCH, R. The aetiology of tuberculosis (A translation by Pinner B & Pinner M). **National Tuberculosis Association**, New York, 1932.

KOMAI-KOMA, M. et al. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 3029–3034, 2004.

KORBEL, D. S.; SCHNEIDER, B. E.; SCHAIBLE, U. E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 9, p. 995–1004, 2008.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, p. 525–32, 2003.

KUMAR H.; KAWAI T.; AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 4, p 621-650, 2009.

KURSAR, M. et al. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 2661–2665, 2007.

LAGOUMINTZIS, G. et al. TNF-alpha Induction by Pseudomonas aeruginosa Lipopolysaccharide or Slime-glycolipoprotein in Human Monocytes is Regulated at the Level of Mitogen-activated Protein Kinase Activity: A Distinct Role of Toll-like Receptor 2 and 4. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, n. 2, p. 193–203, 2008.

LIENHARDT, C. et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 32, p. 1605–1613, 2002.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 15–22, 2010.

LIU, C. Y. et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. **Laboratory Investigation**, v. 93, p. 844-854, 2013.

LIU, G. et al. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4+CD25+ T cells in mice. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, p. 130–142, 2011.

LIU, H. et al. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 7048–7053, 2006.

LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, p. 1770–1773, 2006.

LÓPEZ, B. et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 133, p. 30–37, 2003.

LORENZ E. et al. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6398-6401, 2000.

LOUTEN, J.; BONIFACE, K.; DE WAAL MALEFYT, R. Development and function of TH17 cells in health and disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 1004–11, 2009.

LU, Y. et al. Expansion of CD4(+) CD25(+) and CD25(-) T-Bet, GATA-3, Foxp3 and ROR $\gamma$ t cells in allergic inflammation, local lung distribution and chemokine gene expression. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e19889, 2011.

MACMICKING, J. D. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 5243–5248, 1997.

MAILLOUX, A. W. et al. Expansion of effector memory regulatory T cells represents a novel prognostic factor in lower risk myelodysplastic syndrome. **Journal of Immunology**, v. 189, p. 3198–208, 2012.

MANICASSAMY, S.; PULENDRAN, B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. **Seminars in Immunology**, v. 21, p. 185–193, 2009.

MCBRIDE, A.; KONOWICH, J.; SALGAME, P. Host Defense and Recruitment of Foxp3(+) T Regulatory Cells to the Lungs in Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection Requires Toll-like Receptor 2. **PLoS Pathogens**, v. 9, p. e1003397, 2013.

MCHUGH, R. S. et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **Immunity**, v. 16, n. 2, p. 311-323, 2002.

MEANS, T. K. et al. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 4074–4082, 2001.

Menzies D. Interpretation of Repeated Tuberculin Tests. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.159, n. 1, p. 15-21, 1999

MIETTINEN, M. et al. Live Lactobacillus rhamnosus and Streptococcus pyogenes differentially regulate Toll-like receptor (TLR) gene expression in human primary macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, p. 1092–1100, 2008.

MORRISON, J.; PAI, M.; HOPEWELL, P.C. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 359–368, 2008.

MORTAZ, E. et al. New Aspects in Immunopathology of Mycobacterium tuberculosis. **Immunology**, v. 2012, p.1-11, 2012.

MURRAY, H. W. et al. Regulatory Actions of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 in Leishmania donovani. **Infection in the Liver Infection and Immunity, Immunity**, v.81, n.7, p. 2318–2326, 2013.

NOSS, E. H. et al. Toll-Like Receptor 2-Dependent Inhibition of Macrophage Class II MHC Expression and Antigen Processing by 19-kDa Lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 910–918, 2001.

OBONYO, M. et al. Deficiencies of Myeloid Differentiation Factor 88, Toll-Like Receptor 2 (TLR2), or TLR4 Produce Specific Defects in Macrophage Cytokine Secretion Induced by *Helicobacter pylori*. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2408–2414, 2007.

OHASHI, K. et al. Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 558–561, 2000.

PAI, M. et al. Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon-gamma assay. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medical**, v 174, n. 3, p. 349–355, 2006.

PALMA, C. et al. The Toll-like Receptor 2/6 Ligand MALP-2 Reduces the Viability of *Mycobacterium tuberculosis* in Murine Macrophages. **The Open Microbiology Journal**, v.3, p.47-52, 2009.

POMPEI, L. et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 5192–5199, 2007.

POULSEN, A. Some clinical features of tuberculosis. I. Incubation period. **Acta Tuberculosea Scandinavica**, v. 24, n. 3-4, p. 311–346, 1950.

RAJARAM, M. V. S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 929–942, 2010.

REDFORD, P. S. et al. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 2200–2210, 2010.



REILING, N. et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Mediated Pathogen Recognition in Resistance to Airborne Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 3480–3484, 2002.

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

RUSSELL, D.G. et al. The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p. 594-600, 2009.

SAIGA, H.; SHIMADA, Y.; TAKEDA, K. Innate Immune Effectors in Mycobacterial Infection. **Clinical Developmental Immunology**, v. 2011, p. 347594, 2011.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. **International Reviews of Immunology**, v. 24, p. 211–226, 2005.

SANCHEZ, A. M. et al. The Development and Function of Memory Regulatory T Cells after Acute Viral Infections. **The Journal of Immunology**, 2012.

SCANGA, C. A. et al. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 347–58, 2000.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose**. Brasília - DF: [s.n.], 2013.

SERGEJEVA, S. et al. Interleukin-17 as a Recruitment and Survival Factor for Airway Macrophages in Allergic Airway Inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 33, p. 248–253, 2005.

SHAFIANI, S. et al. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 1409–1420, 2010.

SHEVACH, E. M. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 389–400, 2002.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology**, v. 191, p. 378–387, 1994.

SRIDHAR, S.; POLLOCK, K.; LALVANI, A. Redefining latent tuberculosis. **Future Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1021–35, 2011.

STARK, M. A. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v. 22, p. 285–294, 2005.

STRINGARI, L. L. Influência de células T reguladoras na atividade microbicida de pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis com teste tuberculínico positivo e negativo frente ao desafio com cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e multidroga-resistentes. **Vitória: Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas - Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, p. 110, 2012.**

SUGAWARA, I. et al. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. **Microbiology and Immunology**, v. 47, p. 327–336, 2003.

SUTMULLER, R. P. et al. J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, p. 485-94, 2006.

SUTMULLER, R. P. M. et al. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 8, p. 387–93, 2006.

SUTMULLER, R.; GARRITSEN, A.; ADEMA, G. J. Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66 Suppl 3, p. iii91–5, 2007.

SUZUKI, Y.; CONLEY, F. K.; REMINGTON, J. S. Importance of endogenous IFN- $\gamma$  for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 6, p. 2045–2050, 1989.

SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, p. 655–669, 2000.

TAAMS L.S. et al. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Human Immunology**, v. 66, n. 3, p. 222-230, 2005.

TAPPING, R. I.; TOBIAS, P. S. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, p. 264–268, 2003.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. **Microbiologia**, 6<sup>a</sup> ed. Artmed Editora, p. 311, 2000.

UEHORI, J. et al. Simultaneous Blocking of Human Toll-Like Receptors 2 and 4 Suppresses Myeloid Dendritic Cell Activation Induced by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Peptidoglycan. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4238–4249, 2003.

UNDERHILL, D. M et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 25, p. 14459–14463, 1999.

VAN CREVEL, R; OTTENHOFF, T. H. M; VAN DERMEER, J.W. M. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 294–309, 2002.

VAZQUEZ-TORRES A et al. Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 670- 674, 1999.

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

VUKMANOVIC-STEJIC, M. et al. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 2423–2433, 2006.

WALLGREN, A. The time-table of tuberculosis. **Tubercle**, v. 29, n. 11, p. 245–251, 1948.

WANG, J. E. et al. Involvement of CD14 and Toll-Like Receptors in Activation of Human Monocytes by *Aspergillus fumigatus* Hyphae. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 2402–2406, 2001.

WANG, R.; STEPHENS, J.; LACY, M. J. Characterization of monoclonal antibody HTA125 with specificity for human TLR4. **Hybridoma and Hybridomics**, v. 22, p. 357–365, 2003.

WERGELAND, I.; ASSMUS, J.; DYRHOL-RIISE, A. M. T regulatory cells and immune activation in *Mycobacterium tuberculosis* infection and the effect of preventive therapy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 234–242, 2011.

WHO. Global tuberculosis control: WHO report 2012. **World Health Organization**, 2012.

WILD, C. A. et al. Toll-like Receptors in Regulatory T Cells of Patients With Head and Neck Cancer. **Archives of Otolaryngologyhead Neck Surgery**, v. 136, p. 1253–1259, 2010.

WOLF, A. J. et al. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 105–115, 2008.

WOLF, A.J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2509-2519, 2007.

YAMADA, H. et al. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1  $\alpha/\beta$  double-knockout mice. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 5, p. 759–767, 2000.

YANAGAWA, Y.; ONOÉ, K. Enhanced IL-10 production by TLR4 and TLR2-primed dendritic cells upon restimulation. **Journal of Immunology**, v. 178, p. 6173-6173- 6180, 2007.

YOSHIMURA, A. et al. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 1–5, 1999.

ZAKI, H. Y. et al. Common polymorphisms in TLR4 gene associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in the Sudanese. **The Internacional Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v. 16, n. 7, p. 934-940, 2012.

ZHAI, Y. et al. CD4<sup>+</sup> T regulatory cell induction and function in transplant recipients after CD154 blockade is TLR4 independent. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 5988–5994, 2006.

ZHANG, N. et al. Inhibition of TLR4 signaling prolongs Treg-dependent murine islet allograft survival. **Immunology Letters**, v. 127, p. 119–125, 2010.

ZINK, A et al. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 355–66, 2001.

## **8. Anexos**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da pesquisa:** AVALIAÇÃO DO PAPEL DE RECEPTORES DO TIPO TOLL NA MODULAÇÃO DA FUNÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS E SEU IMPACTO NA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS SADIOS (REATIVOS OU NÃO AO TESTE TUBERCULÍNICO) E NA TUBERCULOSE PULMONAR

ENTIDADE EXECUTORA: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues

O Sr(a) está sendo convidado a participar da pesquisa “**Avaliação do papel de receptores do tipo Toll na modulação da função e frequência de células T reguladoras e seu impacto na resposta imune de indivíduos sadios sadios (reativos ou não ao teste tuberculínico) e na tuberculose pulmonar**”. O objetivo do estudo é avaliar o papel de receptores do tipo Toll 2, 4 e 9 na atividade e frequência de células T reguladoras, visando a melhor compreensão da resposta imune durante essa infecção e desenvolvimento futuro, de novas estratégias terapêuticas, profiláticas e de diagnóstico para o controle dessa doença. A tentativa de compreender as diferenças relacionadas a progressão da doença entre indivíduos com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis PPD+ e PPD-, é de grande importância para a saúde pública, devido ao grande número de casos, 100.000 /ano no Brasil, (TEIXEIRA *et al.*, 2007) 9,27 milhões/ano em todo mundo (WHO, 2009) e facilidade na disseminação da doença. Será colhido aproximadamente 40 ml de sangue para realização dos experimentos (isolamento de monócitos, linfócitos e infecção *in vitro* de sangue total e células mononucleares). Todos os procedimentos serão realizados “*in vitro*”, seguindo os padrões de biossegurança. A coleta do sangue será realizada em uma das veias do braço, com material descartável, podendo causar desconforto e em alguns casos deixar hematoma, que frequentemente melhora em alguns dias. Os resultados da pesquisa serão divulgados em congressos e revistas científicas com sigilo à identidade dos participantes, além disso, todas as informações pessoais, os resultados dos exames e o número de registro de cada participação no estudo será confidencial. Somente você e as pessoas envolvidas no estudo (médicos, enfermeiras, a Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de

Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo) terão acesso a elas. Todos os participantes, têm a garantia de esclarecimento de qualquer dúvida, antes, durante e após o curso da pesquisa, estando livres para recusar-se a participar da pesquisa, ou retirar este consentimento a qualquer momento, sem pena ou prejuízo ao cuidado. Não haverá remuneração aos participantes, mas as despesas relacionadas ao transporte e/ou outras necessárias a participação da pesquisa, serão ressarcidas.

Para melhor compreensão de seu estado de saúde e dos resultados obtidos durante o estudo, se você (seu representante legal) concordar em participar, você deverá:

1. Informar aos médicos sobre problemas de saúde no passado, ou remédios que esteja tomando no momento.
2. Fazer uma consulta geral que irá incluir entre outras coisas exame físico, peso, pressão arterial e frequência cardíaca.
3. Fazer exame de sangue para HIV, mesmo que você já tenha feito em outro lugar.
4. Fazer Raio-X dos pulmões para avaliar a extensão da sua tuberculose. Se você já fez um Raio-X de pulmão há menos de duas semanas não será necessário repetir.
5. Fazer exame do escarro para confirmar se você está mesmo com tuberculose.
6. Fazer exame de sangue para avaliar o seu estado de saúde e se você tem outras doenças.
7. Fazer o teste de reatividade cutânea a tuberculina (PPD), para avaliar tuberculose latente ou não.

### **Contato**

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

Núcleo de Doenças Infecciosas - NDI / CCS

Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe Vitória - ES

CEP: 29043-900 Tel/Fax: (55) 27 - 3335-7210

Luciana Polaco Covre

Mestranda do Programa de Doenças Infecciosas - UFES

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

Núcleo de Doenças Infecciosas - NDI / CCS

Email: [lu\\_pcovre@hotmail.com](mailto:lu_pcovre@hotmail.com)



Cel: (027) 9909-9858

Este termo é composto de duas vias de igual conteúdo, sendo a primeira para arquivamento pelo pesquisador e a segunda para o paciente ou seu representante legal.

Eu,.....dou meu consentimento para participar desta pesquisa, após ter lido, recebido esclarecimentos e compreendido.

, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
(Local e data)

---

Assinatura do Participante

(Sujeito da pesquisa ou seu representante)

Eu expliquei a proposta deste estudo para o voluntário (seu representante legal). Tenho plena convicção que ele/ela entendeu o objetivo, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo.

---

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do pelo telefone 33357208 (responsável: Drieli).