

# ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS EM PACIENTES PORTADORES DE TUBERCULOSE PULMONAR

Saara Barros Nascimento (bolsista do PIBIC/CNPQ), Raimundo Nonato da Silva (colaborador, UFPI), Rubens de Sousa Santana (colaborador, UFPI), Adalberto Socorro da Silva (orientador, Departamento de Biologia, UFPI)

## Introdução

A tuberculose (TB) permanece como uma das doenças infecciosas mais importantes em termos de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Na maioria dos indivíduos, a infecção com o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), seu principal agente etiológico, provoca uma resposta imune específica que resolve a infecção. Em alguns pacientes, entretanto, a eliminação das bactérias não ocorre. Tal persistência parece estar associada a uma imunidade Th1 ineficiente. A identificação de subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Treg) com função imunossupressora, juntamente com a demonstração de que elas podem suprimir a resposta Th1 efetora contra patógenos infecciosos, expandiu nosso entendimento dos mecanismos de regulação das respostas de células T durante processos infecciosos. Estas células diferem das células CD4<sup>+</sup> efetoras por expressar o fator de transcrição fundamental para o desenvolvimento e função supressora dessas células, conhecido como FoxP3. Relatos recentes indicam que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> também podem contribuir para a modulação negativa das respostas imunes anti-TB, de modo que o controle da infecção é dado por um balanço entre respostas imunes efetoras e supressoras. Outro mecanismo que parece importante nessa imunossupressão é a ocorrência de células emigrantes tímicas recentes (PTK7<sup>+</sup>), cuja imaturidade impede que haja uma resposta celular efetiva. O presente estudo tem como objetivo determinar a frequência das células Treg em pacientes portadores de tuberculose pulmonar. A título de acréscimo, antecipará alguns pontos interessantes que serão objetos de estudo em trabalhos posteriores.

## Metodologia

As amostras de sangue periférico (5 ml) foram coletadas dos pacientes portadores de tuberculose pulmonar internados no serviço de Pneumologia do Hospital Getúlio Vargas, Teresina – Piauí, após assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido especialmente elaborado para este estudo. Além do material biológico, os pacientes contribuíram com informações referentes às suas condições gerais. As amostras foram levadas ao Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB) – Universidade Federal do Piauí (UFPI), onde foram processadas segundo as especificações do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPI.

O sangue periférico foi submetido à separação de células com Ficoll-paque. As células mononucleadas foram isoladas e passaram pelo processo de separação magnética negativa de linfócitos T. Para isso, foram usados anticorpos marcados com biotina, direcionados a todas as células brancas, exceto linfócitos T. Em seguida, anticorpos anti-biotina magnetizados foram adicionados à mistura. Assim, somente os linfócitos T não ficaram retidos na coluna magnética. Eles foram coletados e a imunofenotipagem realizada, recorrendo-se a anticorpos direcionados aos marcadores típicos das células Treg (CD25/Foxp3/CD4) e conjugados com os seguintes fluorocromos: anti-CD25 com FITC; anti-Foxp3 com PE e anti-CD4 com PerCP. Como supracitado, pontos extras serão ressaltados, como a busca de células emigrantes tímicas recentes. Para tal, foram usados anticorpos anti-PTK7 conjugados com PE. A suspensão obtida foi avaliada quanto à expressão dos marcadores em citômetro de fluxo (BD, FACSCanto II), através do software BD FACSDiva®.

Para comparação entre a porcentagem de células Treg ( $CD4^+CD25^{hi} Foxp3^+$ ) em pacientes portadores de tuberculose pulmonar no início do tratamento e controles saudáveis, que é objetivo central do nosso estudo, foi usado o Teste-t não pareado através do software GraphPad Prism 5. Para as comparações, por hora, secundárias, foi usado o teste One-Way ANOVA, do mesmo software. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

### Resultados e Discussão

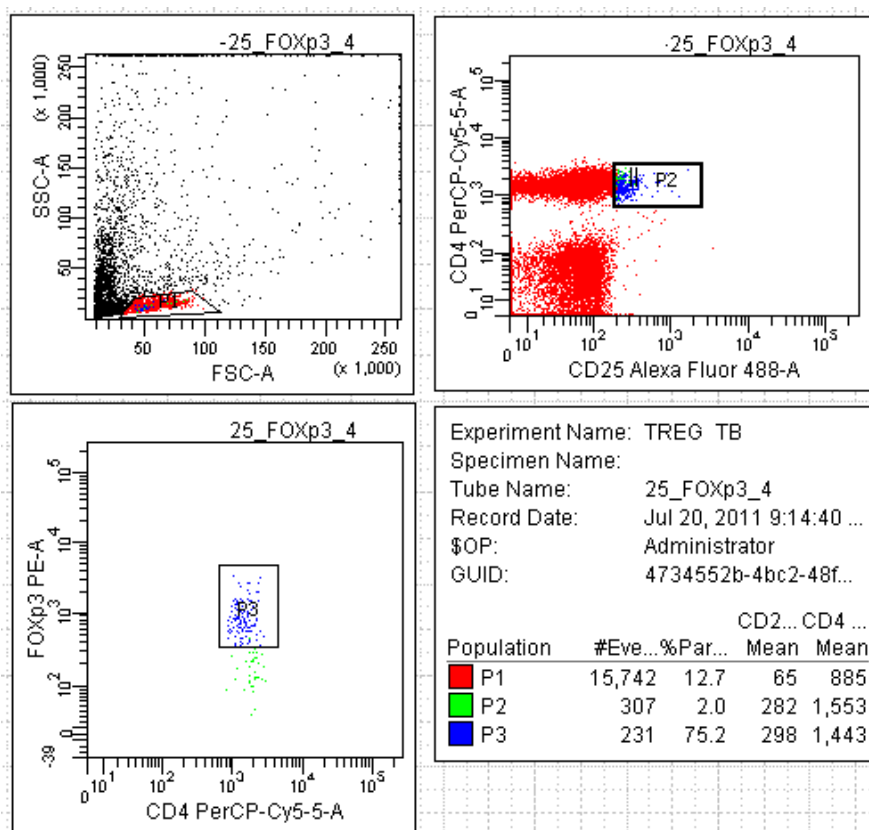


FIGURA 01. Análise da expressão de FoxP3 nas células  $CD4^+CD25^{hi+}$  em paciente portador de tuberculose pulmonar (nesse caso, o sangue passou pelo processo de purificação). Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB), Teresina, 2011.

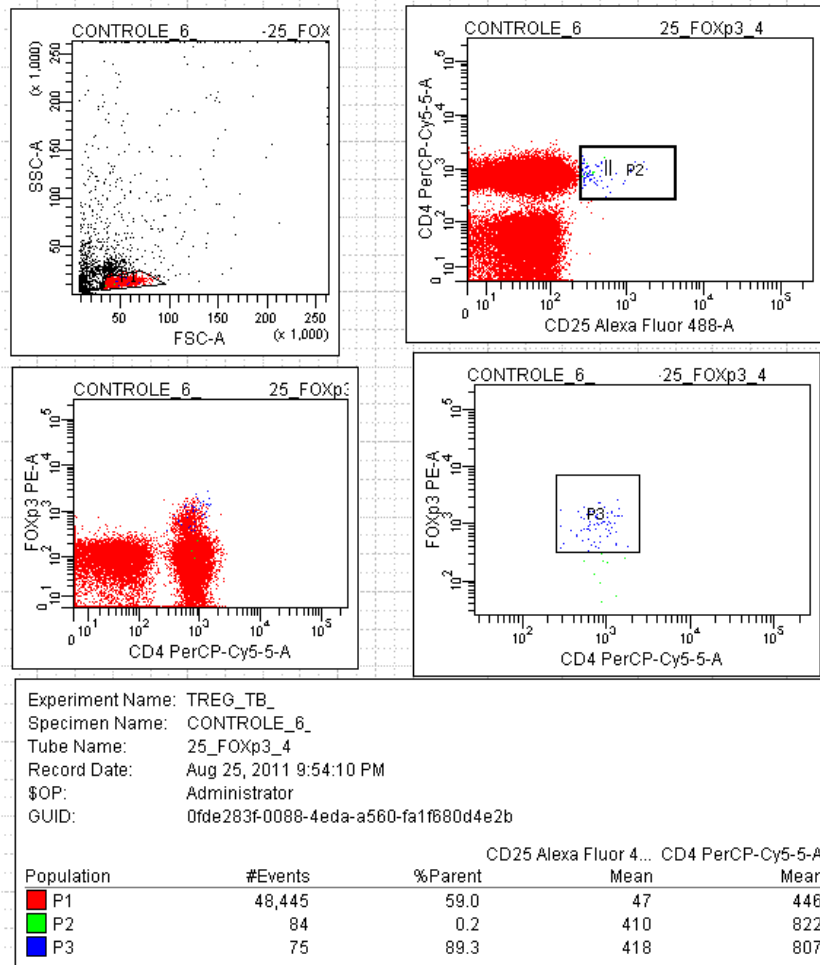


FIGURA 02. Análise da expressão de FoxP3 nas células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi+</sup> em controle saudável. Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB), Teresina, 2011.

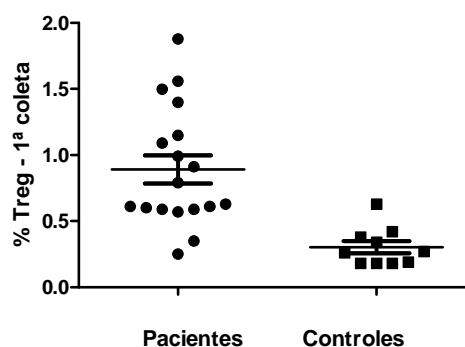


FIGURA 03. Comparação entre a porcentagem de células Treg encontradas no sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar no início do tratamento (n=18) e controles saudáveis (n=10) (p=0,0005). Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB), Teresina, 2011.

É possível perceber um aumento da população de células Treg nos pacientes com tuberculose pulmonar, quando comparado com os indivíduos saudáveis. Nos casos de tuberculose essa população corresponde em média a  $0.8928\% \pm 0.1067\%$  (N=18) da população de linfócitos; nos pacientes saudáveis essa porcentagem passa a ser de  $0.3030\% \pm 0.04583\%$  (N=10) (p=0,0005) (FIGURAS 01, 02 e 03). Portanto, os

resultados sugerem um maior *out put* tímico de células com fenótipo regulador no contexto da tuberculose pulmonar. Não obstante os nossos achados, serão necessários estudos funcionais adicionais para avaliarmos se o aumento dessa população celular é uma estratégia empregada pelo patógeno para evasão da resposta imune inflamatória.

Quando analisados os questionários aplicados para análise do perfil dos pacientes com tuberculose, foi possível perceber que é guardada uma relação dos sintomas clínicos com fatores de risco, idade e porcentagem de células Treg encontradas no sangue periférico do paciente. Assim, quanto mais células com o fenótipo  $CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$  e/ou mais idoso o paciente e/ou mais fatores de risco estiverem associados, maior tende a ser a quantidade e/ou intensidade dos sintomas referidos.

Num segundo momento, procurar-se-á saber se essas células são ou não emigrantes tímicas recentes. Para isso, serão buscadas aquelas células que possuem o marcador de superfície PTK7, nelas expresso. A teoria é que porcentagem significativa dessas células seja emigrante tímica recente, fato que explicaria sua imaturidade e consequente limitação da função efetora das células T. Todo o tratamento dos pacientes será acompanhado, para, com isso, observar que no decorrer do tratamento há uma diminuição da quantidade dessas células. A seguir (FIGURAS 04 e 05), serão apresentados alguns resultados parciais, uma espécie de prévia do que continuará sendo feito.

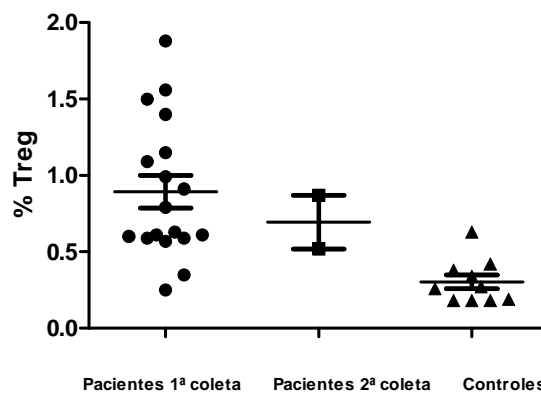


FIGURA 04. Comparação entre a porcentagem de células Treg encontradas no sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar no início do tratamento (n=18), pacientes com 3 meses de tratamento (n=2) e controles saudáveis (n=10) (p= 0,0018). Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB), Teresina, 2011.

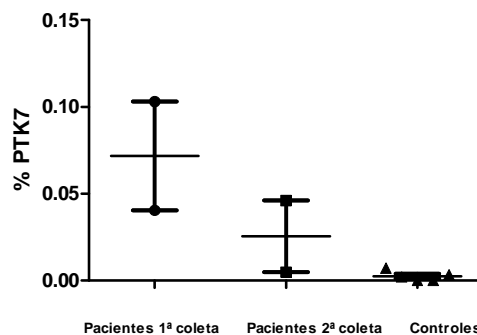


FIGURA 05. Comparação entre a porcentagem de células Treg que são PTK7+ encontradas no sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar no início do tratamento (n=2), pacientes com 3 meses de tratamento (n=2) e controles saudáveis (n=10) (p=0,0251). Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB), Teresina, 2011.

Outro objetivo do trabalho que continuará, é tentar elucidar alguns mecanismos de ação das células nTreg. Muitos estudos mostram que o contato célula-célula é necessário. Outros sugerem o papel de citocinas como a IL-10 e o TGF- $\beta$ 1. Será investigado, o quão importante é o papel das citocinas nesse mecanismo, através de sua busca no plasma dos pacientes.

### **Conclusão**

Os pacientes portadores de tuberculose pulmonar possuem um aumento na frequência de células T reguladoras naturais, bem como uma elevação relativa na quantidade de células T com fenotipagem característica de emigrantes tímicos recentes. Portanto, esses probandos têm uma configuração imunológica tipicamente favorável ao desenvolvimento da doença, provavelmente em função de uma resposta imunitária de defesa ineficiente.

### **Apoio**

Esse trabalho foi financiado e apoiado pelo Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

**Palavras-chave:** Tuberculose. Imunorregulação. Células T.

### **Referências Bibliográficas**

DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. **Lancet**. 367:938, 2006.

FONTENOT, J. D., AND A. Y. RUDENSKY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat Immunol**. 6:331, 2005.

GUYOT-REVOL, V., J. A. INNES, S. HACKFORTH, T. HINKS, AND A. LALVANI. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**. 173:803, 2006.

HAINES, C. J. ET AL. Human CD4+ T Cell recent Thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. **JEM**. v. 206, 2009.

HE, XY., XIAO, L., CHEN, HB., LI, J., WANG, YJ., HE, K., GAO, Y., SHI, BY. Tregulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 29: 643, 2010.

HIRSCH, C. S. ET AL. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. **J Infect Dis**. 180:2069, 1999.

JO, E. K., J. K. PARK, AND H. M. DOCKRELL. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. **Curr Opin Infect Dis**. 16:205, 2003.

LIENHARDT, C., A. ET AL. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. **Eur J Immunol**. 32:1605, 2002.

MCGUIRK, P., AND K. H. MILLS. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. **Trends Immunol**. 23:450, 2002.

RIBEIRO-RODRIGUES, R., T. RESENDE CO, R. ROJAS, Z. TOOSI, R. DIETZE, W. H. BOOM, E. MACIEL, AND C. S. HIRSCH. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clin Exp Immunol.** 144:25, 2006.

RONCADOR, G., *ET AL.* Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. **Eur J Immunol.** 35:1681, 2005.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol.** 6:345, 2005.