

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

BRENDA CRISTINA VITTI

Infeção de linfócitos T CD8+ por vírus Influenza

Ribeirão Preto, 2023

BRENDA CRISTINA VITTI

Infeção de linfócitos T CD8+ por vírus Influenza

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Virologia

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Ribeirão Preto
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

VITTI, BRENDA CRISTINA

Infecção de linfócitos T CD8+ por vírus Influenza.

Ribeirão Preto, 2023.

44 páginas.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Virologia.

Orientador: Arruda, Eurico de.

1. Influenza A; 2. Linfócitos T CD8+; 3. Linfócitos T citotóxicos; 4. Infecção viral.

Folha de aprovação da banca examinadora

Nome: VITTI, Brenda Cristina

Título: Infecção de linfócitos T CD8+ por vírus Influenza.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

SUPORTE FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro das seguintes instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n. 2021/05869-1.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo n. 130768/2021-9.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, que me orienta e cuida de mim em todos os momentos da minha vida, permitindo-me seguir meu próprio caminho.

Expresso minha gratidão aos meus pais, cujo constante incentivo aos meus estudos e dedicação em proporcionar as condições ideais para meu crescimento e desenvolvimento são inestimáveis. Em especial, minha mãe, minha verdadeira confidente e melhor amiga, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. A você, minha querida mãezinha, agradeço de coração por tudo.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Patogênese Viral, em particular ao Professor Eurico, por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar no grupo e expandir meu conhecimento e crescimento pessoal. Agradeço também a Pitty por todas as ajudas e por ser uma amiga para nós. Agradeço também ao Ronaldo e Juliano, que como pós-doutorandos do laboratório, me apoiaram muito durante meu trabalho. E, é claro, agradeço a todos os amigos da virologia que me acolheram no grupo e com os quais criei laços de amizade, tornando os dias de trabalho mais alegres.

Gostaria também de agradecer as instituições de financiamento FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro ao trabalho.

Obrigada!

RESUMO

VITTI, B. C. **Infecção de linfócitos T CD8+ por vírus Influenza**. 2023. Dissertação (Mestrado em Virologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Os vírus Influenza são responsáveis por infecções agudas do trato respiratório superior e inferior, doença conhecida como gripe. Estimativas indicam que milhões de casos de doença respiratória aguda são causados por infecção pelo vírus Influenza, resultando em cerca de 200 mil óbitos anualmente. Os linfócitos T CD8+ desempenham um papel fundamental na imunidade adaptativa, atuando na eliminação de patógenos intracelulares através da indução de programas apoptóticos nas células infectadas, promovendo *clearance* viral. A infecção de linfócitos T CD8+ pelo vírus Influenza é um fenômeno surpreendente e levanta questionamentos sobre os possíveis efeitos dessa infecção na função efetora dos linfócitos. Dessa forma, por meio de um modelo de infecção *in vitro*, o presente estudo buscou compreender melhor as características e consequências dessa infecção em linfócitos T CD8+. Para isso, linfócitos T CD8+ foram isolados de amostras de tonsilas e sangue periférico pelo método de seleção negativa e em seguida foram infectados com o vírus Influenza. Os achados apresentados neste estudo revelam que os linfócitos T CD8+ tonsilares e derivados do sangue periférico são suscetíveis à infecção pelo vírus Influenza *in vitro*, porém com baixa permissividade. A suscetibilidade dos linfócitos T CD8+ à infecção varia entre os indivíduos. A infecção por IAV promove aumento significativo na expressão das citocinas IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-6 e IL-10, que também varia em intensidade de acordo com o indivíduo. No entanto, não são observadas alterações na expressão do fator de transcrição T-bet e da proteína efetora granzima B, importantes moléculas efetoras de linfócitos T CD8+.

Palavras-chave: Influenza A. Linfócitos T CD8+. Linfócitos T citotóxicos. Infecção viral

ABSTRACT

VITTI, B. C. **Infection of CD8+ T lymphocytes by Influenza virus**. Dissertação (Mestrado em Virologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Influenza viruses are responsible for acute infections of the upper and lower respiratory tract, a disease known as the flu. Estimates indicate that millions of cases of acute respiratory disease are caused by Influenza virus infection, resulting in about 200,000 deaths annually. CD8+ T lymphocytes play a fundamental role in adaptive immunity, acting in the elimination of intracellular pathogens through the induction of apoptotic programs in infected cells, promoting viral clearance. The infection of CD8+ T lymphocytes by the Influenza virus is a surprising phenomenon and raises questions about the possible effects of this infection on the effector function of lymphocytes. Thus, through an in vitro infection model, the present study sought to better understand the characteristics and consequences of this infection in CD8+ T lymphocytes. For this, CD8+ T lymphocytes were isolated from samples of tonsils and peripheral blood by the negative selection method and then infected with the Influenza virus. The findings presented in this study reveal that tonsillar and peripheral blood-derived CD8+ T lymphocytes are susceptible to infection by the Influenza virus in vitro, but with low permissiveness. The susceptibility of CD8+ T lymphocytes to infection varies between individuals. IAV infection promotes a significant increase in the expression of cytokines IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-6 and IL-10, which also varies in intensity according to the individual. However, changes in the expression of the T-bet transcription factor and granzyme B effector protein, important effector molecules of CD8+ T lymphocytes, are not observed.

Keywords: Influenza A. CD8+ T lymphocytes. Cytotoxic T lymphocytes. Viral Infection.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1: Esquema representativo da partícula de IAV..... | 12 |
| Figura 2: Ciclo replicativo de IAV..... | 14 |
| Figura 3: Ativação, diferenciação e mecanismos de morte de linfócitos T CD8+ citotóxicos. | 17 |
| Figura 4: Linfócitos T CD8+ tonsilares naturalmente infectados por IAV..... | 18 |
| Figura 5: Esquema representativo do fluxo experimental..... | 27 |
| Figura 6: Linfócitos T CD8+ tonsilares são susceptíveis a infecção in vitro por IAV..... | 29 |
| Figura 7: Linfócitos T CD8+ tonsilares são pouco permissivos à replicação de IAV..... | 30 |
| Figura 8: Células epiteliais de linhagem Calu-3 infectadas por IAV..... | 30 |
| Figura 9: Linfócitos T CD8+ do sangue periférico são susceptíveis a infecção in vitro por IAV..... | 31 |
| Figura 10: Frequência de infecção por IAV em linfócitos T CD8+ do sangue periférico. | 32 |
| Figura 11: Linfócitos T CD8+ do sangue periférico são pouco permissivos a replicação de IAV..... | 33 |
| Figura 12: A infecção por IAV de linfócitos T CD8+ do sangue periférico induz aumento na produção de citocinas..... | 34 |
| Figura 13: A expressão do fator de transcrição T-bet não é alterada pela infecção por IAV. | 35 |
| Figura 14: A infecção de linfócitos T CD8+ por IAV não altera a expressão de granzima B. | 37 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 | Classificação e estrutura do vírus Influenza A | 11 |
| 1.2 | Ciclo replicativo de IAV | 12 |
| 1.3 | Características da infecção por Influenza, sazonalidade e epidemiologia | 14 |
| 1.4 | Linfócitos T CD8+: desenvolvimento e função efetora na resposta imune | 15 |
| 1.5 | Infecção de linfócitos T CD8+ por IAV | 17 |
| 2. | OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 | Objetivo geral | 20 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 20 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 | Propagação de estoque viral | 21 |
| 3.2 | Quantificação viral | 21 |
| 3.3 | Processamento de amostras | 22 |
| 3.3.1 | Processamento de tonsilas palatinas | 22 |
| 3.3.2 | Processamento de sangue periférico | 23 |
| 3.4 | Seleção negativa de linfócitos T CD8+ | 23 |
| 3.5 | Infecção com IAV | 24 |
| 3.6 | PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) | 24 |
| 3.6.1 | qRT-PCR por TaqMan | 24 |
| 3.6.2 | qRT-PCR por SYBR Green | 24 |
| 3.7 | Imunofluorescência | 25 |
| 3.8 | Citometria de fluxo | 26 |
| 4. | RESULTADOS | 28 |
| 4.1 | Linfócitos T CD8+ tonsilares são susceptíveis a infecção <i>in vitro</i> por IAV | 28 |
| 4.2 | Linfócitos T CD8+ tonsilares são pouco permissivos a replicação de IAV | 29 |
| 4.3 | A infecção de linfócitos T CD8+ humanos não se restringe a linfócitos tonsilares | 30 |
| 4.4 | Frequência de infecção por IAV em linfócitos T CD8+ do sangue periférico | 31 |
| 4.5 | Linfócitos T CD8+ do sangue periférico são pouco permissivos a replicação de IAV | 32 |
| 4.6 | A infecção por IAV de linfócitos T CD8+ do sangue periférico induz aumento na produção de citocinas | 33 |
| 4.7 | A expressão do fator de transcrição T-bet em linfócitos T CD8+ não é alterada pela infecção por IAV | 34 |
| 4.8 | A infecção de linfócitos T CD8+ por IAV não altera a expressão de granzima B | 35 |
| 5. | DISCUSSÃO | 38 |

| | | |
|----|--------------------------|----|
| 6. | CONCLUSÃO | 42 |
| 7. | REFERÊNCIAS | 43 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Classificação e estrutura do vírus Influenza A

Os Vírus Influenza são formados pelos gêneros *Alpha* (Influenza A), *Beta* (Influenza B), *Delta* (Influenza D) e *Gammainfluenzavirus* (Influenza C), e pertencem à família *Orthomyxoviridae* [ICTV Taxonomy, 2022]. São vírus envelopados, com forma predominantemente esférica com diâmetro de aproximadamente 100 nm, mas podem apresentar-se também em forma filamentosa, com diâmetro de aproximadamente 100 nm e comprimento de 20 µm, e genoma segmentado de RNA de fita simples de polaridade negativa [Shaw & Palese, 2013]. Os vírus Influenza A (IAV) e Influenza B (IBV) têm 8 segmentos de RNA, e os vírus Influenza C (ICV) e Influenza D (IDV) têm 7 segmentos. No envelope viral dos IAVs estão inseridas as glicoproteínas de superfície Hemaglutinina (HA), Neuraminidase (NA), e a proteína de canal iônico (M2). Abaixo do envelope viral encontra-se a proteína M1, que forma a matriz viral, e o complexo proteico NEP/NS2 (proteína de exportação nuclear/proteína não estrutural 2). O genoma viral é associado a proteínas que formam o complexo ribonucleoproteico (RNP), que consiste em: nucleoproteína (NP), polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2) e a polimerase ácida (PA) [Wright et al., 2013]. As extremidades de cada segmento do genoma viral formam um grampo helicoidal e são recobertas pelo complexo das polimerases virais, enquanto o restante do segmento é recoberto pelas NP [Bouvier & Palese, 2008]. Para os IAVs a capacidade codificante do genoma é maior devido à ocorrência de *splicing* nos segmentos 7 e 8, e pela existência de *Open Reading Frames* (ORFs) alternativas no segmento 2. Sendo assim, em IAV o segmento 1 codifica a proteína PB2; o segmento 2 codifica a proteína PB1 e pode codificar as proteínas acessórias PB1-F2 (com atividades pró-apoptótica e supressora da resposta imune inata) e PB1-N40 (função ainda não estabelecida); o segmento 3 codifica a proteína PA; o segmento 4, a proteína HA; o segmento 5, a proteína NP; o segmento 6 codifica a proteína NA; o segmento 7 codifica as proteínas M1 e M2, e o segmento 8 as proteínas NS1 (suprime a resposta imune inata e dificulta a transcrição e tradução dos RNA mensageiros do hospedeiro) e NEP/NS2 (atuam na exportação nuclear do RNP viral) [Shaw & Palese, 2013; HAO et al, 2020].

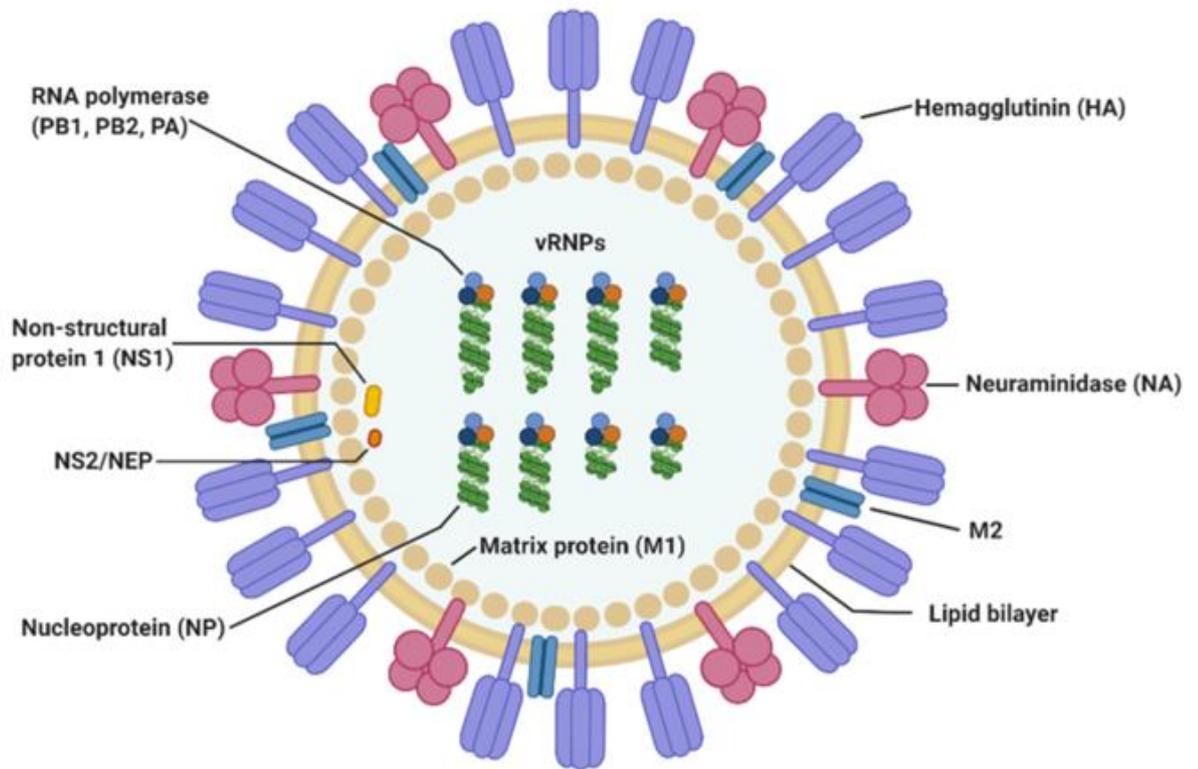


Figura 1: Esquema representativo da partícula de IAV. Fonte: Jung & Lee, 2020.

1.2 Ciclo replicativo de IAV

O ciclo replicativo do vírus influenza se inicia com a entrada do vírus nas células epiteliais do trato respiratório [Yamada et al., 2006]. Para isso, a proteína HA se liga a ácidos siálicos de glicoproteínas da superfície da célula hospedeira, desencadeando a endocitose do vírus [Watanabe et al., 2012]. O endossomo contendo o IAV trafega em direção ao núcleo da célula enquanto o seu lúmen se acidifica, e o baixo pH promove mudanças conformacionais na proteína HA que levam à fusão das membranas do envelope viral e do endossomo, liberando o genoma e ribonucleoproteínas virais no citoplasma da célula hospedeira [Fontana & Steven, 2015]. No interior do endossomo a proteína M2 do envelope do vírus atua como canal iônico que bombeia prótons H^+ do lúmen endossomal para o interior da partícula viral, auxiliando na dissociação das interações entre M1 e as RNPs, permitindo que estas sejam liberadas no citoplasma juntamente com o genoma viral [Rossman & Lamb, 2011]. Para início da replicação, os complexos RNP são importados ativamente para o núcleo da célula por possuírem sinais de endereçamento nuclear [Rossman & Lamb, 2011].

No interior do núcleo as polimerases virais replicam os segmentos do genoma viral em duas etapas, sendo primeiro gerados RNAs de polaridade positiva complementares a cada segmento de RNA genômico viral, que são então utilizados como molde para síntese do genoma viral de polaridade negativa. A transcrição de RNAs mensageiros virais inicia-se com a retirada do *cap* (estrutura da região 5' com guanina modificada) dos RNA mensageiros da célula hospedeira para sua utilização como *primer* para início da transcrição viral. O *cap snatching* depende da interação de polimerases virais com a enzima RNA polimerase II durante a transcrição dos RNA mensageiros celulares, possibilitando que PB2 se ligue ao *cap* dos transcritos nascentes e PA clive-os. Durante a transcrição, os RNA mensageiros virais são poliadenilados em sua extremidade 3' pelas próprias polimerases virais e ao final são exportados para o citoplasma, onde são traduzidos [Shaw & Palese, 2013; De Vlugt et al., 2018].

Após a tradução, as glicoproteínas de superfície HA, NA e M2 de IAV trafegam pela via secretória em direção à membrana plasmática. Já as ribonucleoproteínas são importadas para o núcleo, onde ocorre a montagem dos complexos RNPs que, com auxílio do complexo NEP/NS2 e da proteína M1 são exportados para o citoplasma, onde interagem com endossomos de reciclagem, e são endereçados para a membrana plasmática para que ocorra a montagem da partícula viral. Na membrana plasmática ocorre o acúmulo das glicoproteínas HA, NA e M2 de IAV, a associação de M1 a esta região da membrana, e a chegada dos endossomos contendo as RNPs. O acúmulo das proteínas na região de membrana induz a sua curvatura até que ocorra cisão, pela ação de M2 e, conseqüentemente, o brotamento viral. Após o brotamento as partículas de IAV permanecem ligadas à superfície celular por meio da interação entre HA e ácidos siálicos. A NA então atua como sialidase e cliva as ligações, permitindo a liberação de IAV [Shaw & Palese, 2013; Rossman & Lamb, 2011; Bedi & Ono, 2019; Pohl et al., 2016].

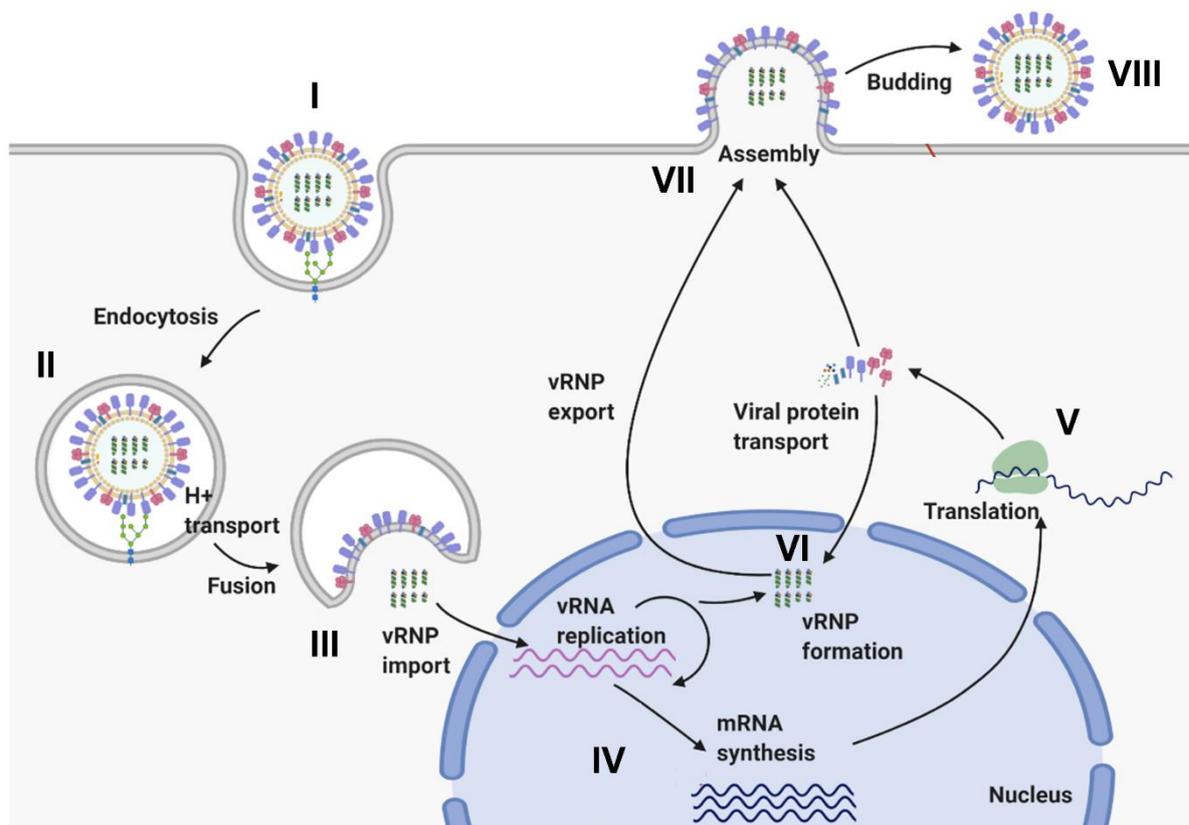


Figura 2: Ciclo replicativo de IAV. (I) Reconhecimento e endocitose da partícula viral. (II) Acidificação endossomal. (III) Liberação do genoma e das ribonucleoproteínas virais. (IV) Replicação e transcrição do genoma viral. (V) Tradução dos RNA mensageiros em proteínas. (VI) Montagem dos complexos RNPs. (VII) Montagem da partícula viral. (VIII) Brotamento viral. **Fonte:** Modificado de Jung & Lee, 2020.

1.3 Características da infecção por Influenza, sazonalidade e epidemiologia

Os vírus Influenza são agentes causais de infecções agudas do trato respiratório superior e inferior, junto com sintomas sistêmicos que caracterizam uma síndrome conhecida como “gripe”. Em humanos, a transmissão de Influenza ocorre pela via respiratória através de gotículas, aerossóis e contato com fômites seguido de autoinoculação. No organismo, o vírus infecta o epitélio respiratório e após cerca de dois dias iniciam-se os sintomas respiratórios e sistêmicos: tosse seca, faringite, congestão e secreção nasal, febre, cefaleia, mialgia e adinamia. O quadro pode ainda progredir para pneumonia, complicação mais grave da gripe [Shaw & Palese, 2013; Rello & Pop-Vicas, 2009; Javanian et al., 2021].

A circulação de vírus influenza é sazonal, com maior frequência em meses mais frios do ano, podendo acontecer esporadicamente, ou em surtos, epidemias e até pandemias. Variantes epidêmicas do IAV surgem pelo acúmulo de mutações pontuais que não são corrigidas por ausência de atividade exonuclease 3' (*drift* antigênico) e pela recombinação de segmentos

do genoma de RNA de vírus Influenza de diferentes espécies (*shift* antigênico). O *drift* antigênico ocorre mais comumente, e o surgimento destas variantes associa-se à ocorrência de surtos de influenza, enquanto que o *shift* antigênico é menos comum, e as variantes que surgem por *shift* podem ser altamente transmissíveis e/ou virulentas, características que, combinadas com a falta de imunidade na população, podem levar à disseminação geográfica do vírus, até mesmo em nível global, como ocorreu na pandemia de H1N1 no ano de 2009 [Javanian et al., 2021; Webster & Govorkova, 2014; Shaw & Palese, 2013]. Estudos estimam que 2 a 5 milhões de casos de doença respiratória aguda ocorrem em decorrência de infecção pelo vírus Influenza, levando a aproximadamente 200 mil óbitos por ano [Iuliano et al., 2018; GBD, 2017].

1.4 Linfócitos T CD8+: desenvolvimento e função efetora na resposta imune

Linfócitos T CD8⁺ são importantes células efetoras da imunidade adaptativa que induzem a morte de células infectadas por vírus ou células tumorais. Essas células têm origem na medula óssea e durante o processo de maturação migram para o timo, onde ocorre o arranjo do receptor da célula T (TCR) e a expressão dos correceptores, neste caso o correceptor CD8. Após maturação, os linfócitos T CD8⁺ saem do timo e, no contexto de uma infecção, encontram células apresentadoras de antígeno (APCs) que apresentam antígenos virais para linfócitos T CD8⁺ no contexto do complexo principal de histocompatibilidade do tipo I (MHC I), tornando estes linfócitos T CD8⁺ específicos para o antígeno que lhes foi apresentado. O processo de apresentação de antígeno e desenvolvimento de especificidade pode ocorrer na corrente sanguínea e em tecidos linfoides periféricos, como baço e linfonodos [Abbas et al., 2015; Chapman et al., 2020; Verdon et al., 2020; Adams et al., 2020].

Ainda no contexto de uma infecção viral, os linfócitos T CD8⁺ específicos circulam pela corrente sanguínea em direção a órgãos linfoides secundários e reconhecem seus antígenos específicos, desencadeando o início do programa de ativação, que envolve a expansão clonal e diferenciação. Na expansão clonal ocorre a proliferação de células T CD8⁺ específicas para o antígeno viral pelo qual foram ativadas, e na diferenciação, os clones específicos se diferenciam em linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs), células efetoras que migram para os locais de infecção e causam a morte de células infectadas por vírus. O mecanismo de morte celular é desencadeado pelo reconhecimento específico de células-alvo por CTLs, que estabelecem uma estreita proximidade com a célula alvo, processo que resulta na formação da “sinapse imunológica”, permitindo a ativação de uma cascata de sinalização nas CTLs, que culmina na

exocitose de grânulos contendo perforinas e granzimas). Além do reconhecimento do antígeno específico, o processo de ativação de T CD8⁺ requer a presença de moléculas coestimuladoras como CD28 e B7, e citocinas, como IL-2 e IL-12 [Adams et al., 2020; Simons et al., 2019].

As perforinas danificam as membranas de células-alvo e as granzimas ativam caspases apoptóticas, levando à morte da célula infectada [Adams et al., 2020; Kaech et al., 2012]. Outro mecanismo pelo qual os CTLs induzem a morte celular se dá pela expressão da proteína de membrana FasL, que se liga ao receptor de morte Fas expresso por outras células infectadas e desencadeia a ativação de caspases apoptóticas [Krammer, 2000]. Além dos mecanismos de morte citados, os CTLs também produzem citocinas que atuam na morte de células, como IFN- γ , que estimula a fagocitose por macrófagos, e TNF- α , que pode levar à morte da célula-alvo ao ativar a cascata de necrose [Verdon et al., 2020].

Um outro estado de maturação de linfócitos T CD8⁺ corresponde aos linfócitos T CD8⁺ de memória, que se formam durante a diferenciação ou a partir de células efetoras. As células de memória permanecem vivas após eliminação do patógeno viral e, em um posterior contato com o antígeno específico, são reativadas. A manutenção deste *pool* de células de memória permite que o organismo responda de forma mais rápida e efetiva ao patógeno viral mesmo após um longo tempo do primeiro contato [Kaech & Cui, 2021; Surh & Sprent, 2008]. Já em infecções prolongadas os CTLs podem tornar-se irresponsivos, entrando em exaustão celular. Uma das características de linfócitos T CD8⁺ exauridos é o aumento na expressão de PD-1, receptor coinibitório de superfície que impede a ativação dos linfócitos T CD8⁺ [Verdon et al., 2020].

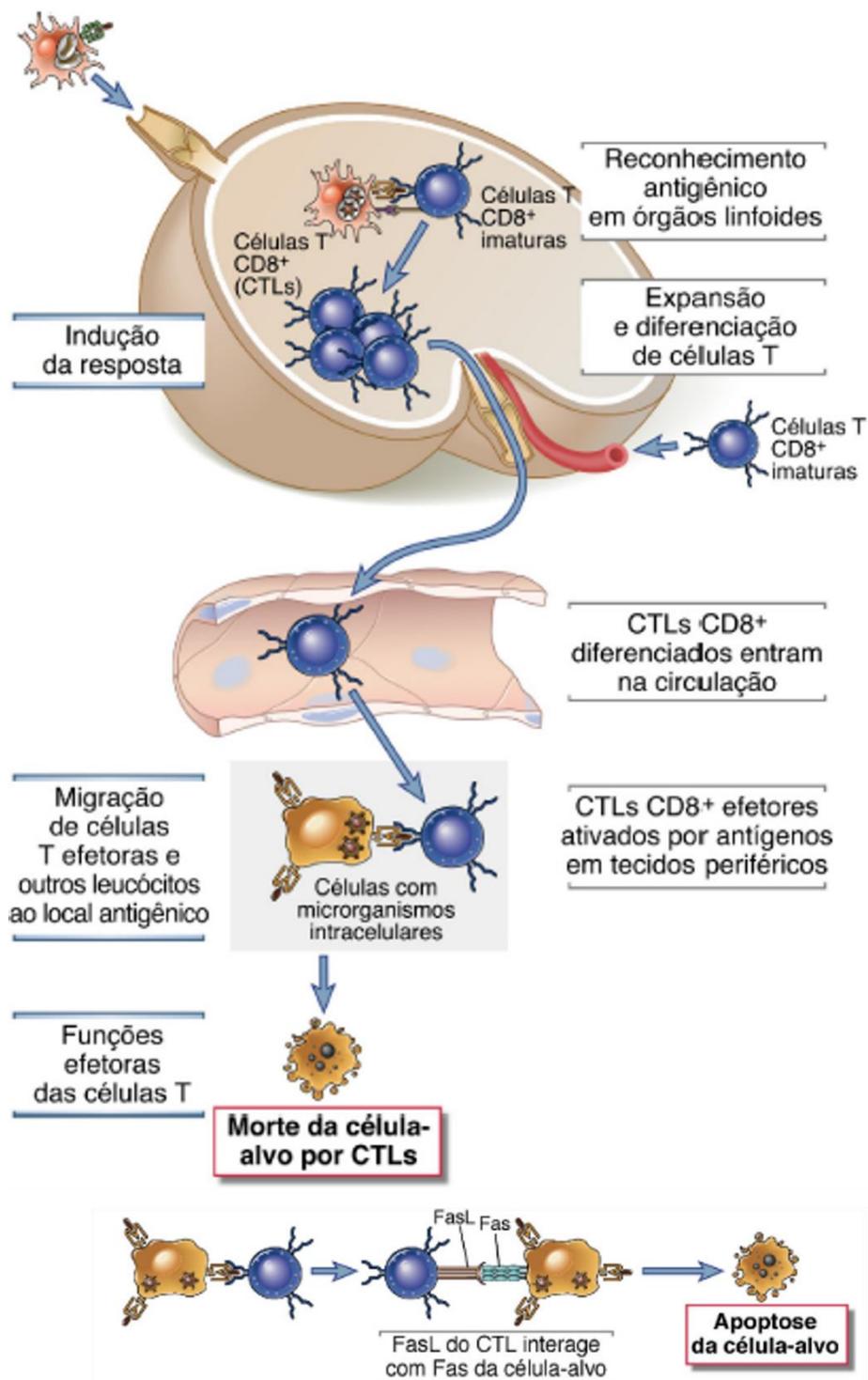


Figura 3: Ativação, diferenciação e mecanismos de morte de linfócitos T CD8+ citotóxicos. Fonte: Modificado de Abbas et al., 2015.

1.5 Infecção de linfócitos T CD8+ por IAV

Órgãos linfóides secundários do trato respiratório superior são locais cruciais para montagem de respostas imunes contra infecções respiratórias. Eles atuam como uma interface

de comunicação entre o patógeno e as células do sistema imune, possibilitando a ativação e diferenciação destas células para geração de respostas contra a infecção. As tonsilas palatinas e adenoides são órgãos linfoides secundários do trato respiratório superior e neles circulam células do sistema imune, como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos [Van Kempen et al., 2000].

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa evidenciaram a presença de vírus respiratórios, incluindo influenza A e B, em amostras de secreções nasofaríngeas, tonsilas palatinas e adenoides de crianças sem sintomas de infecção respiratória aguda [Proença-Modena et al., 2012]. Com relação especificamente ao IAV, um outro estudo do nosso grupo demonstrou que IAV causa infecção natural de linfócitos B e T CD8+ em tonsilas palatinas e adenoides, e chamou atenção que a média de T CD8+ infectados por IAV foi de 5,2% e 3,9% respectivamente em tonsilas palatinas e adenoides, em crianças assintomáticas [Castro et al., 2020].

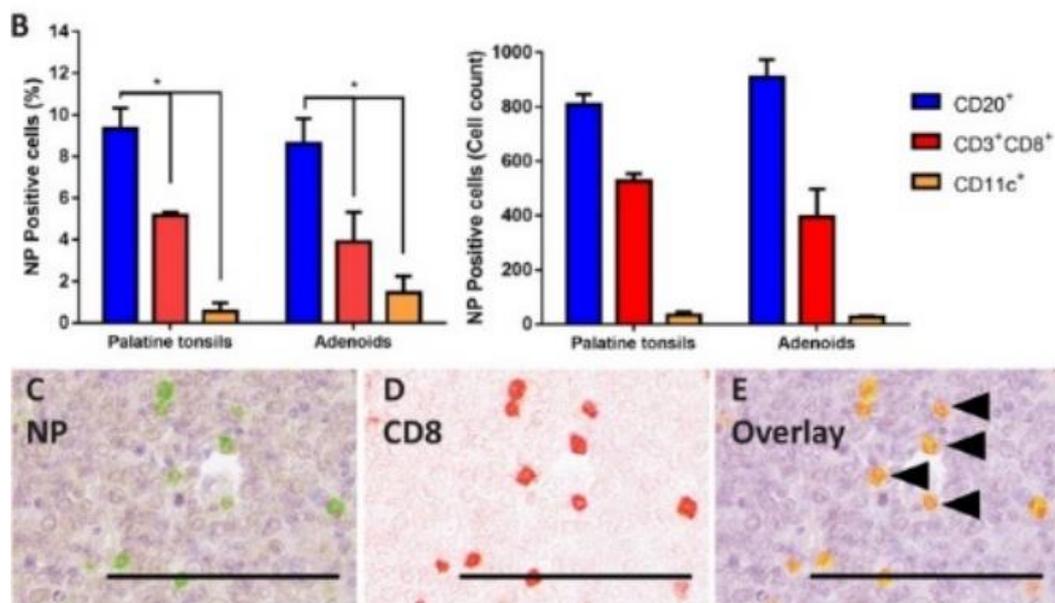


Figura 4: Linfócitos T CD8+ tonsilares naturalmente infectados por IAV. (B) Porcentagem de linfócitos T CD8+ positivos para NP em tonsilas palatinas e adenoides (primeiro gráfico); contagem de linfócitos T CD8+ positivos para NP em tonsilas palatinas e adenoides (segundo gráfico) (barras vermelhas). (E) Imunohistoquímica da sobreposição da marcação de NP em verde (C) e do fenótipo CD8 em vermelho (D), revelando a infecção de linfócitos T CD8+ humanos por IAV. **Fonte:** Castro et al., 2020.

Diante do inédito achado de infecção natural em células T CD8+ por IAV em 5% de crianças sem sintomas de infecção respiratória aguda, é essencial investigar como é possível a infecção prolongada/persistente, justamente de células cuja principal função é eliminar células

infectadas. A relação vírus-célula de IAV com T CD8⁺ em infecções prolongadas deve ser diferente daquela estabelecida em células epiteliais, por exemplo, nas quais a infecção frequentemente resulta em morte celular. Esta foi a motivação do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características da infecção *in vitro* de linfócitos T CD8+ humanos pelo vírus IAV, destacando os possíveis impactos desta infecção na função efetora dos linfócitos T CD8+.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a susceptibilidade de linfócitos T CD8+ humanos a infecção *in vivo* por IAV por técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo.
- Avaliar a replicação e permissividade de IAV através da quantificação de carga viral intracelular e no sobrenadante de culturas de linfócitos T CD8+ por meio de RT-qPCR.
- Mensurar a produção de citocinas por linfócitos T CD8+ infectados e não infectados por IAV por meio de RT-qPCR, a fim de investigar possíveis alterações na função efetora destas células.
- Quantificar a expressão da proteína efetora granzima B e do fator de transcrição T-bet em linfócitos T CD8+ infectados e não infectados por IAV por meio de RT-qPCR, a fim de investigar possíveis alterações na função efetora destas células.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Propagação de estoque viral

Para propagação de estoque viral, alíquotas de vírus Influenza A da linhagem A/California/04/2009pdm (H1N1) (Cal/09) foram inoculadas em garrafas (75cm²) de células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) aproximadamente 90% confluentes, e completadas com 2 ml de meio DMEM sem soro fetal bovino (SFB), 1% antibiótico e antimicótico (ab/am) suplementado com tripsina-TPCK 1ug/ml, totalizando 5 ml de inóculo. As garrafas foram mantidas por 1 hora em agitação lenta, a temperatura ambiente e, em seguida, completadas para 10 ml com meio DMEM sem SFB, 1% ab/am e tripsina-TPCK 1µg/ml e mantidas em estufa 5% CO₂ a 37°C até observação de efeito citopático. Após 48 horas de infecção foi observado efeito citopático característico do vírus Influenza, correspondente a formação de focos de células arredondadas, que se destacam da monocamada e, portanto, foi realizada a coleta do vírus. Para isso, as células da monocamada foram descoladas com raspadores de células e centrifugadas, juntamente com o sobrenadante celular, a uma velocidade de 12.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. Após clarificação, os sobrenadantes celulares foram transferidos para outros tubos, centrifugados novamente nas mesmas condições, alíquotados em alíquotas de 500 µl e armazenados em freezer -80°C. O estoque original da linhagem foi cedido pelo professor Dr. Edison Durigon.

Além disso, vale ressaltar que durante a propagação de estoque viral também foram preparados estoques contendo somente o sobrenadante de culturas de células MDCK não infectadas. Estes estoques são denominados como MOCK e foram utilizados como controles não infectados nos ensaios de infecção. Eles foram preparados simultaneamente ao estoque viral, utilizando as células na mesma passagem e submetendo-as às mesmas condições das células infectadas.

3.2 Quantificação viral

Os estoques virais foram titulados pelo método de quantificação de unidades formadoras de placas (PFU). Para isso, células MDCK foram semeadas em placas de 6 poços e infectadas ao atingirem confluência de aproximadamente 95%. Inicialmente as células da monocamada foram lavadas 3 vezes em PBS e, em seguida, inoculadas com 1 ml de inóculo viral diluído seriadamente em uma proporção de 1:10 (100 µl vírus + 900 µl DMEM sem SFB, 1% ab/am e tripsina-TPCK 1µg/ml). As células foram mantidas em agitação lenta, a temperatura ambiente

durante 1 hora para adsorção viral e após esse tempo foi retirado inóculo viral e foram adicionados 2 ml de overlay de agarose low gelling temperature 0,9% com DMEM 1x suplementado com tripsina-TPCK. Após 6 dias de infecção o *overlay* foi retirado através da adição de formaldeído 10% e de lavagens em água corrente. A placa foi corada com solução de cristal violeta e foi realizada a contagem de PFU. O título viral obtido foi de $1,7 \times 10^5$ por 100 μl .

3.3 Processamento de amostras

3.3.1 Processamento de tonsilas palatinas

Tonsilas palatinas de pacientes com hipertrofia tonsilar são removidas rotineiramente no Hospital Estadual de Ribeirão Preto, armazenadas em RPMI-1640 10% SFB 4% ab/am e enviadas para o Laboratório de Patogênese Viral (LPV – FMRP USP) devido a colaboração com serviço de Otorrinolaringologia (Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço – FMRP USP). Em nosso laboratório, as tonsilas palatinas utilizadas neste trabalho foram lavadas três vezes em PBS para remoção de sangue e outros fluidos e, em seguida, seccionadas com bisturi em pequenos fragmentos para facilitação do processo de dissociação enzimática. A dissociação enzimática foi realizada através da adição dos fragmentos tonsilares em solução de PBS contendo as enzimas colagenase (100U/ml) e dispase (0.6U/ml) (Gibco™), seguida da incubação a 37°C, sob agitação constante e proteção da luz. Em seguida, o tecido dissociado foi filtrado em *Cell strainer* (Falcon®) de 100 μm para obtenção de uma suspensão celular que foi separada para dois processos: parte foi submetida a um gradiente de densidade de Ficoll (Ficoll-Paque®) para separação de linfócitos e parte armazenada em TRIzol (Sigma-Aldrich®), RNA later (invitrogen), e meio de transporte viral para realização de outros estudos. As células submetidas a separação por gradiente de Ficoll foram colocadas sobre o Ficoll em tubos de centrífuga de 15 ml (proporção de duas partes de suspensão celular para uma parte de Ficoll), centrifugadas a $400 \times g$ por 30 minutos a 20°C, com aceleração 9 e desaceleração 0. Após centrifugação a fração correspondente aos linfócitos foi coletada, lavada três vezes em PBS e mantida em frascos de 25 cm^2 , em meio RPMI suplementado com 10% SFB, 4% ab/am, na estufa a 37°C e 5% CO_2 até o dia seguinte. As células mantidas em TRIzol foram utilizadas para posterior identificação de negatividade para IAV por meio de qRT-PCR.

As amostras de tonsilas utilizadas são de pacientes que não apresentaram sintomas de infecção respiratória aguda pelo menos nas 4 semanas que antecederam a cirurgia.

As amostras de tonsilas palatinas foram obtidas em colaboração com os Profs. Drs. Wilma Terezinha Anselmo-Lima, Fabiana Cardoso Valera, Edwin Tamashiro e a aluna Carol Miura.

3.3.2 Processamento de sangue periférico

Amostras de sangue periférico coletadas de doadores saudáveis foram submetidas a separação de linfócitos por meio do gradiente de densidade de Ficoll, da mesma forma como descrito anteriormente. Os linfócitos obtidos também foram armazenados em frascos de 25 cm², em meio RPMI suplementado com 10% SFB, 4% ab/am, na estufa a 37°C e 5% CO₂ até o dia seguinte.

A utilização de amostras humanas está consubstanciada no Comitê de Ética do HC-FMRP-USP, parecer #4.465.408.

3.4 Seleção negativa de linfócitos T CD8+

Os linfócitos que foram obtidos pela separação por gradiente de Ficoll e mantidos na estufa até o dia seguinte foram utilizados para purificação de linfócitos T CD8+ por meio de seleção negativa, realizada utilizando o *kit* 'CD8+ T Cell Isolation Kit' (Miltenyi Biotec). Para isso, os linfócitos foram clareados e incubados com um coquetel de anticorpos biotina-conjugados que se ligavam a todas as células mononucleares, com exceção de linfócitos T CD8+, seguido de incubação com *microbeads* magnéticas que se ligavam à biotina e capturavam as células, restando-as na coluna magnética, de forma que somente os linfócitos T CD8+ puderam passar livremente através da coluna, o que permitiu que a separação fosse feita sem que ocorresse a ativação pela ligação de anticorpo ao TCR. Após coleta dos linfócitos T CD8+, estes foram semeados em placas de 6 poços em meio RPMI 20% SFB, 4% ab/am e colocados em estufa a 37°C e 5% CO₂ até que fosse feita a contagem do número de células para posterior realização das infecções.

3.5 Infecção com IAV

Para infecção os linfócitos T CD8⁺ foram clareados, inoculados com o vírus Influenza A/California/04/2009 diluído em RPMI sem SFB e acrescido de tripsina-TPCK (1µg/ml) por 1 hora sob agitação lenta. Após adsorção viral, a depender do experimento, as células foram centrifugadas a 300 × g por 10 minutos, lavadas em PBS por 3 vezes mediante centrifugações a 300 × g por 10 minutos para remoção do inóculo e em seguida mantidas em meio de cultura RPMI com 20% SFB e 4% ab/am; ou o inóculo não foi lavado e somente completado com o meio de cultura. As etapas de inoculação e centrifugação do inóculo foram realizadas em microtubos.

3.6 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

3.6.1 qRT-PCR por TaqMan

Para confirmação de negatividade das amostras e quantificação de carga viral de IAV os RNAs foram extraídos utilizando o reagente TRIzol e submetidos a transcrição reversa pela enzima *Multiscribe reverse transcriptase* em associação com *primers* randômicos (Applied Biosystems™), ambos processos de acordo com as instruções de seus respectivos fabricantes. O cDNA resultante foi utilizado na reação de qRT-PCR pelo *kit* TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™), com *primers* e sonda específicos para o segmento 7 (gene M) de IAV. As reações foram realizadas com 2 µl de cDNA (a uma concentração total de aproximadamente 100 ng de cDNA), 0,5 µl de *primer forward* e *reverse* (a 10µM), 5 µl de sonda (a 10µM) e 5 µl da polimerase TaqMan, totalizando 10 µl de volume final. As reações ocorreram no termociclador Step-One Plus (Applied Biosystems™) com as seguintes configurações: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 60°C. Plasmídeos contendo parte da sequência do segmento 7 foram utilizados tanto como controle positivo e curva para quantificação de carga (através da diluição seriada do plasmídeo), e a água ultrapura foi utilizada como controle negativo da reação.

3.6.2 qRT-PCR por SYBR Green

Após extração de RNA e transcrição de cDNA como já descrito, as quantificações dos RNA mensageiros das citocinas foram feitas por qRT-PCR utilizando o *kit* SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™), com *primers* e sondas específicos para cada citocina. As reações foram realizadas utilizando 5 µl do agente SYBR Green, 0,125 µl de *primer forward* e *reverse* (a 10µM), e volumes variáveis de água ultrapura e cDNA para que a quantidade de

cDNA inserida na reação fosse aproximadamente 35 ng de cDNA (1700/50 → 1 µl de cDNA). As reações ocorreram no termociclador Step-One Plus com as seguintes configurações: 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de 5 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, seguido da curva de *melting* já definida pelo aparelho. O gene de Beta-actina foi utilizado como controle endógeno da reação e as temperaturas de *melting* foram verificadas para confirmação da amplificação dos alvos específicos. Os cálculos das quantificações foram posteriormente realizados por *Fold Change*.

3.7 Imunofluorescência

Linfócitos T CD8⁺ foram coletados, clarificados, lavados em PBS uma vez e ressuspendidos em 40 µL de PBS para serem plaqueados sobre a superfície de lamínulas tratadas com polilisina. As lamínulas foram mantidas em estufa a 37°C até as células assentarem ao fundo da lamínula e, em seguida, foram lavadas em PBS uma vez e fixadas com formaldeído 4% por 20 minutos. Após fixação as lamínulas foram lavadas em PBS para retirada do excesso do formaldeído e mantidas em PBS na geladeira a 4°C até a realização da técnica de imunofluorescência. Para marcação de imunofluorescência as lamínulas foram lavadas 5 vezes em PBS e incubadas com solução de permeabilização (0,01% Triton 100x em PBS) por 15 minutos, a 37°C. Após permeabilização foi feita a lavagem das lamínulas e bloqueio com a solução *Super Blocking* (Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos, a 37°C. Em seguida as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários, por 1 hora a 37°C, lavadas em PBS e incubadas por mais 1 hora com os anticorpos secundários. Após incubação as lamínulas foram lavadas 10 vezes em PBS e montadas em lâminas contendo solução de montagem Fluormount G (ElectroMicroscopy). Os anticorpos utilizados foram o anti-nucleoproteína do vírus influenza A (ab128193) e anti-CD8 alpha (ab4055).

O tratamento de lamínulas com polilisina consiste na adição de solução de polilisina sobre uma superfície na qual as lamínulas são colocadas sobre e são mantidas em ambiente úmido *overnight*. No dia seguinte as lamínulas tratadas devem ser lavadas em PBS uma vez para retirada do excesso de polilisina e mantidas no fluxo para evaporação do PBS da superfície da lamínula.

3.8 Citometria de fluxo

Nos dias de coleta após a infecção os linfócitos T CD8⁺ foram clareados e lavados em PBS duas vezes para marcação de viabilidade celular, na qual foi realizada incubação com o corante APC Invitrogen™ eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 660 (Invitrogen 65086414) durante 30 minutos, com proteção da luz. Após marcação de viabilidade as células foram lavadas em PBS uma vez e foi feito o bloqueio de antígenos inespecíficos utilizando a solução *Super Blocking* por 15 minutos. Após 15 minutos, o *Super Blocking* foi removido e foi realizada a marcação extracelular com o anticorpo anti-CD8 (Pe-Cy 7 mouse anti-human CD8 – BD Biosciences 557746), por 1 hora a 4°C. Em seguida as células foram lavadas em PBS e permeabilizadas com o tampão *Fixation and Permeabilization (kit Cytofix/Cytoperm – 554714)* (BD) para realização da marcação intracelular para IAV com o anticorpo anti-NP (FITC Influenza A NP Monoclonal Antibody – MA1-7322). A depender do experimento outras marcações foram realizadas, como a marcação intracelular para granzima B (PE mouse anti-human Granzyme B – BD Biosciences 561142) e a marcação intranuclear para T-bet. Para marcação intranuclear foram realizadas etapas de permeabilização das membranas nucleares utilizando os reagentes do *kit FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience™), seguindo as orientações do fabricante. As incubações intracelulares e intranuclear também duraram 1 hora a 4°C e, em seguida, as células foram lavadas em solução *Perm Wash* por 5 vezes, fixadas em formaldeído 1% *overnight* e submetidas a análise por citometria de fluxo no citometro FACSCanto II (BD Biosciences) e com o software FlowJo X.

Durante o experimento todas as etapas ocorreram em placa de 96 poços com fundo em U e todas as centrifugações para lavagens foram de 450 × g por 5 min. Para os ensaios de citometria aproximadamente 100.000 células foram reservadas para cada poço da placa onde ocorreram as marcações. Além disso, os inóculos virais não foram retirados nas infecções que foram realizadas para os ensaios de citometria, já que o objetivo era observar os efeitos da infecção e a não retirada do inóculo permite com que mais células sejam infectadas.

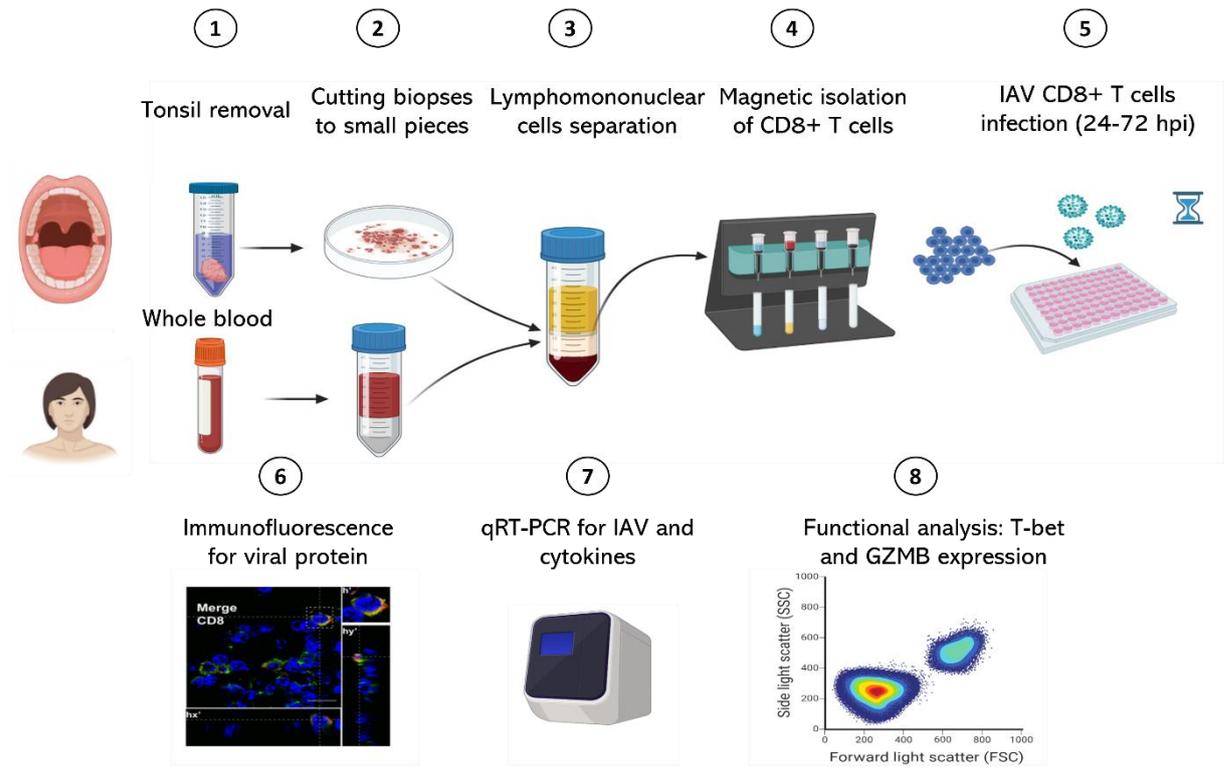


Figura 5: Esquema representativo do fluxo experimental.

4. RESULTADOS

4.1 Linfócitos T CD8⁺ tonsilares são susceptíveis a infecção *in vitro* por IAV

Culturas de linfócitos T CD8⁺ purificados de tonsilas de doadores sem sintomas de infecção foram infectadas com IAV para verificar a susceptibilidade das células à infecção. A imunofluorescência revelou que às 24 horas pós-infecção (hpi) linfócitos T CD8⁺ tonsilares mostraram-se positivos para IAV *in vitro* (E-H). A presença de células T CD8⁺ com marcação positiva para a proteína NP de IAV foi observada em linfócitos T CD8⁺ purificados de tonsilas de 6 diferentes doadores. No tempo de 48 hpi (I-L) foi possível observar a formação de conjuntos de células em estruturas semelhantes a “rosetas” (Figura 6). É razoável supor que tais rosetas se formam devido à presença de HA de IAV nas membranas de células infectadas que interagem com proteínas sializadas presentes na superfície de células adjacentes, infectadas ou não. Este mecanismo seria correlato da hemaglutinação por IAV, conhecido há muitas décadas (Buzzel & Hanig, 1958). Portanto, a infecção natural de linfócitos T CD8⁺ de tonsilas palatinas por IAV observada por Castro et al., 2020 também ocorre *ex vivo* em culturas primárias deste tipo celular.

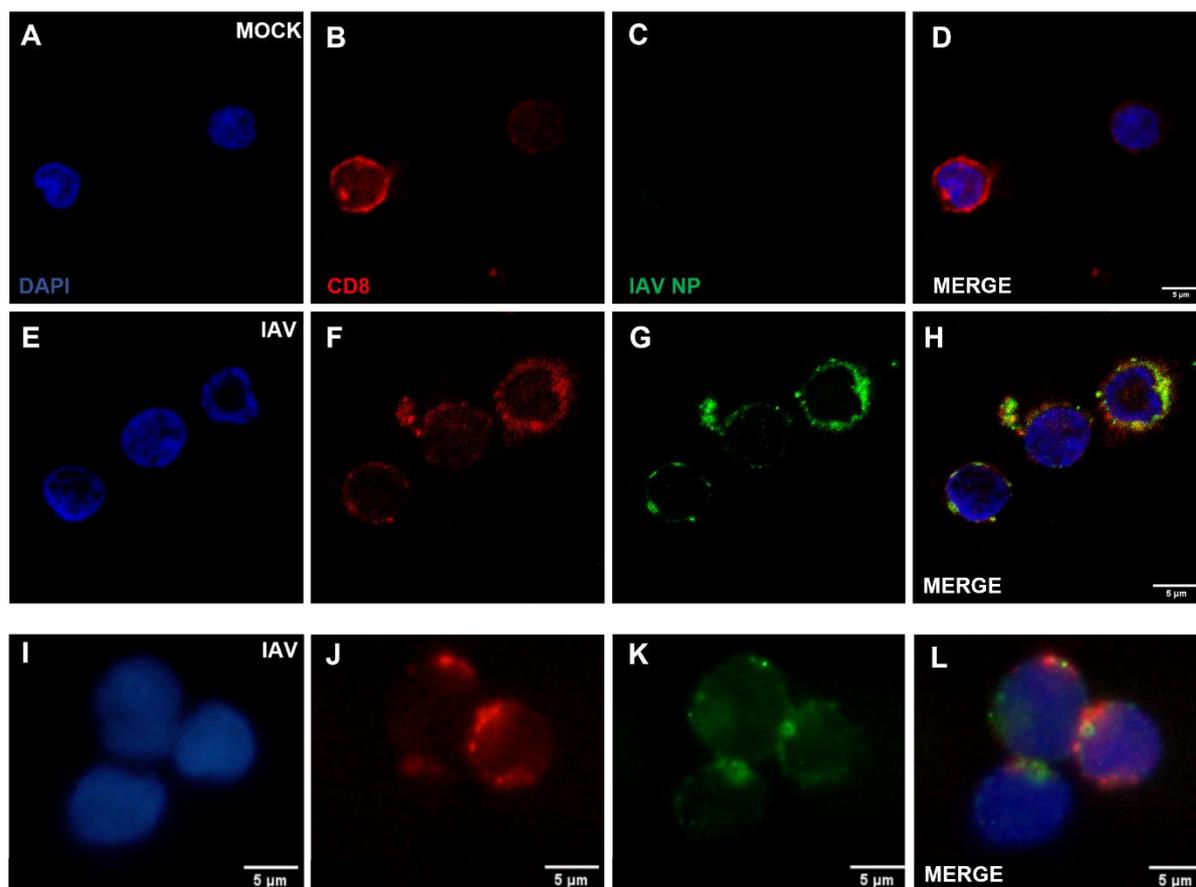


Figura 6: Linfócitos T CD8+ tonsilares são susceptíveis a infecção *in vitro* por IAV. (A-D) Linfócitos T CD8+ 24 horas após inoculação com MOCK (MOI=1). (E-H) Linfócitos T CD8+ 24 hpi por IAV (MOI=1). (I-L) Linfócitos T CD8+ 48 hpi por IAV (MOI=1). (A-H) Linfócitos tonsilares derivados da amostra 735. (I-L) Linfócitos tonsilares derivados da amostra 727.

4.2 Linfócitos T CD8+ tonsilares são pouco permissivos a replicação de IAV

Sabendo que linfócitos T CD8+ tonsilares são susceptíveis à infecção *in vitro* por IAV, buscou-se avaliar a sua permissividade à replicação do vírus. Para isso, ensaios de qRT-PCR foram feitos para quantificação da carga viral de IAV em culturas de linfócitos T CD8+ obtidas de três diferentes doadores. A carga viral do sobrenadante apresentou-se maior do que a carga viral intracelular em todos os tempos coletados nos três diferentes doadores (Figura 7). No intervalo de 24 a 48 hpi ocorreu aumento no número de cópias de RNA do segmento 7 de IAV no sobrenadante dos linfócitos T CD8+ nas três tonsilas, enquanto que no tempo de 72 horas houve redução na carga de RNA do segmento 7 de IAV nos sobrenadantes, sugerindo que a replicação de IAV em linfócitos T CD8+ ocorre de 24 para 48 hpi, e decai com 72 hpi. Não houve diferença significativa na carga viral intracelular entre as culturas obtidas de três doadores diferentes.

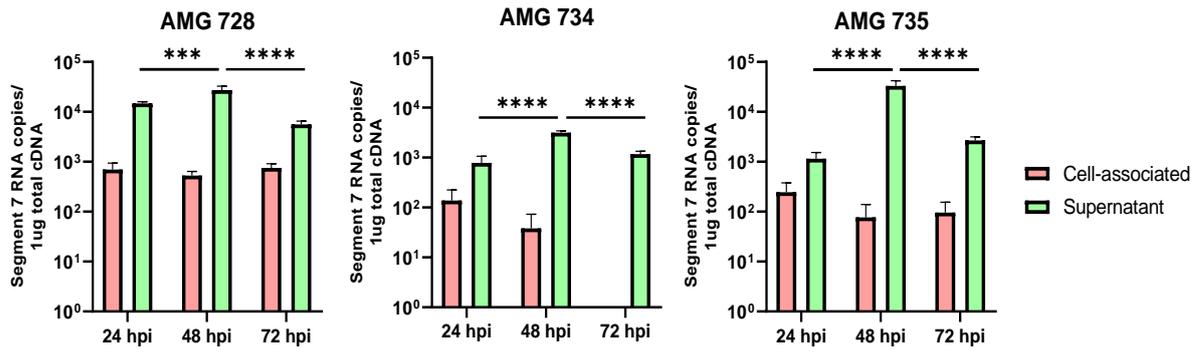


Figura 7: Linfócitos T CD8+ tonsilares são pouco permissivos à replicação de IAV. Quantificação do número de cópias do segmento 7 do genoma de IAV nas células e sobrenadantes de culturas de linfócitos T CD8+, nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Infecção realizada com MOI=0,1 em células da AMG 728, e com MOI=1 das AMG 734 e 735. com MOI=1. Teste estatístico: Two-way ANOVA.

É possível observar que as cargas virais alcançadas às 48hpi, que foi o pico alcançado no sobrenadante, variaram entre 10³ e 10⁴ a partir da mesma MOI. Esses valores de carga viral máxima atingida são menores do que os obtidos em células de natureza epitelial como Calu-3 (Figura 8), indicando que os linfócitos T CD8+ são susceptíveis, mas menos permissivos à replicação de IAV do que células de natureza epitelial. Além da carga viral ter aumentado em mais de 3 logs em Calu-3, houve acúmulo de proteínas virais nessas células (Figura 8).

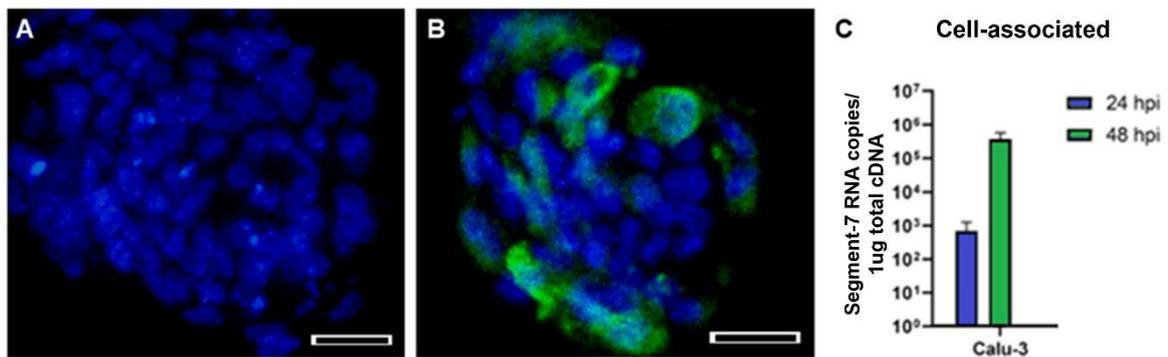


Figura 8: Células epiteliais de linhagem Calu-3 infectadas por IAV. (A) Células Calu-3 controle negativo. (B) Células Calu-3 infectadas por IAV às 48 hpi. (C) Gráfico da carga viral de IAV nos tempos de 24 e 48 hpi.

4.3 A infecção de linfócitos T CD8+ humanos não se restringe a linfócitos tonsilares

A fim de verificar se somente linfócitos T CD8+ tonsilares seriam susceptíveis a infecção *in vitro* por IAV, linfócitos T CD8+ foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis e infectados com IAV. No tempo de 24 hpi linfócitos T CD8+ do sangue

periférico apresentaram-se infectados por IAV (E-H). Como observado para linfócitos T CD8⁺ tonsilares, também há a formação de aglomerados de células derivadas do sangue periférico. A presença de células T CD8⁺ com marcação positiva para a proteína NP de IAV foi observada em linfócitos T CD8⁺ purificados do sangue de 4 doadores saudáveis diferentes. Dessa forma, a infecção *ex vivo* de linfócitos T CD8⁺ não se restringe às células tonsilares, mas também ocorre para linfócitos derivados do sangue periférico.

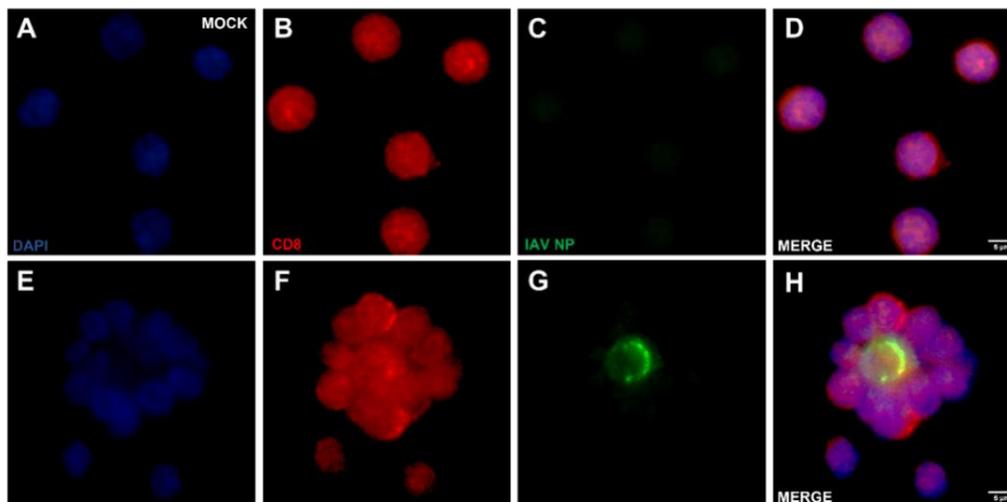


Figura 9: Linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico são susceptíveis a infecção *in vitro* por IAV. (A-D) Linfócitos T CD8⁺ 24 horas após inoculação com MOCK (MOI=1). (E-F) Linfócitos T CD8⁺ 24 h após infecção com IAV (MOI=1).

4.4 Frequência de infecção por IAV em linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico

A fim de avaliar quantitativamente a taxa de infecção por IAV, linfócitos T CD8⁺ obtidos do sangue periférico de seis diferentes doadores foram infectados e coletados após os tempos de 24 e 48 hpi para ensaio de citometria. No tempo de 24 hpi a frequência média de infecção foi de 5,97%, aumentando para 13,57% às 48 hpi, o que indica que houve replicação e propagação viral e permite a confirmação da susceptibilidade de linfócitos T CD8⁺ a infecção *ex vivo* por IAV. No entanto é importante ressaltar que nos ensaios de citometria os inóculos foram mantidos após 1 hora de adsorção e completados com meio de cultura a fim de se obter um maior número de células infectadas. Além disso é válido destacar que a taxa de infecção tem grande variação de acordo com o doador, principalmente no tempo de 48 hpi, como é possível observar no gráfico em B.

A estratégia de *gating* também está ilustrada, incluindo os pontos de cortes das fluorescências negativas (*fluorescence minus one* – FMO) das marcações.

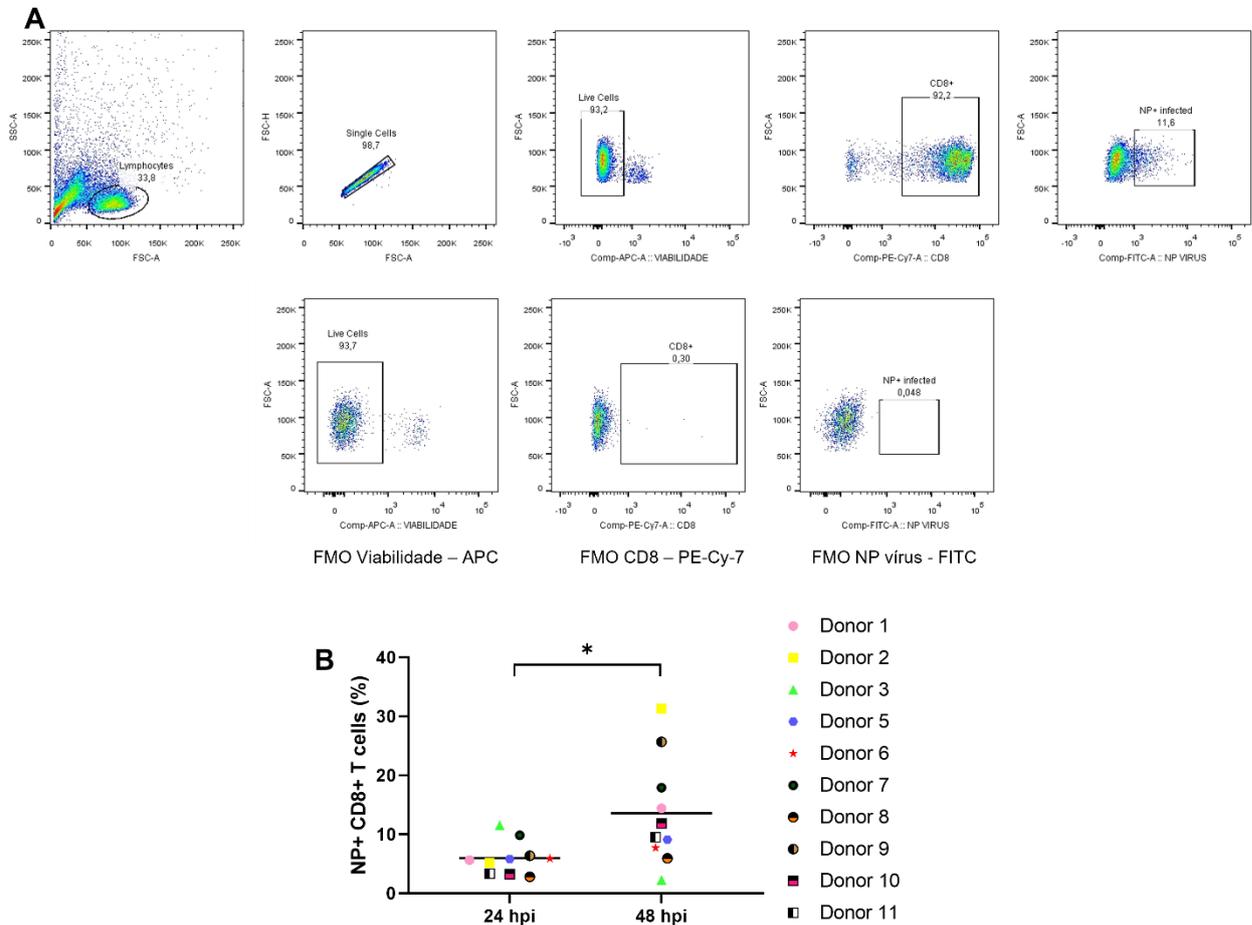


Figura 10: Frequência de infecção por IAV em linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico. (A) *Layouts* representativos da estratégia de *gating*. Os cinco primeiros *layouts* representam as *gating* feitas para separação de linfócitos, células únicas, células vivas, linfócitos T CD8⁺ e células infectadas, respectivamente. Os últimos três *layouts* representam os FMO das marcações. (B) Frequência de linfócitos T CD8⁺ positivos para a proteína viral NP, ou seja, linfócitos infectados, nos tempos de 24 e 48 hpi. Teste estatístico: Unpaired t test.

4.5 Linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico são pouco permissivos a replicação de IAV

A permissividade de linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico foi avaliada através de ensaios de qRT-PCR. Em 11 é possível observar que, com exceção do tempo de 24 hpi da cultura do doador 1, a carga de IAV no sobrenadante apresentou-se maior do que a carga intracelular para todos os tempos coletados nos três diferentes doadores, semelhante ao observado com linfócitos tonsilares. Também não houve alteração da carga viral intracelular no decorrer dos tempos pós-infecção. Já no sobrenadante celular ocorreram aumentos significativos da carga do segmento 7 de 24 e 48 para 72 hpi, não ocorrendo a diminuição observada no tempo de 72

hpi para as células tonsilares, o que pode sugerir que a replicação em linfócitos T CD8⁺ do sangue ocorre mais lentamente ou que a defesa dessas células seja mais tardia.

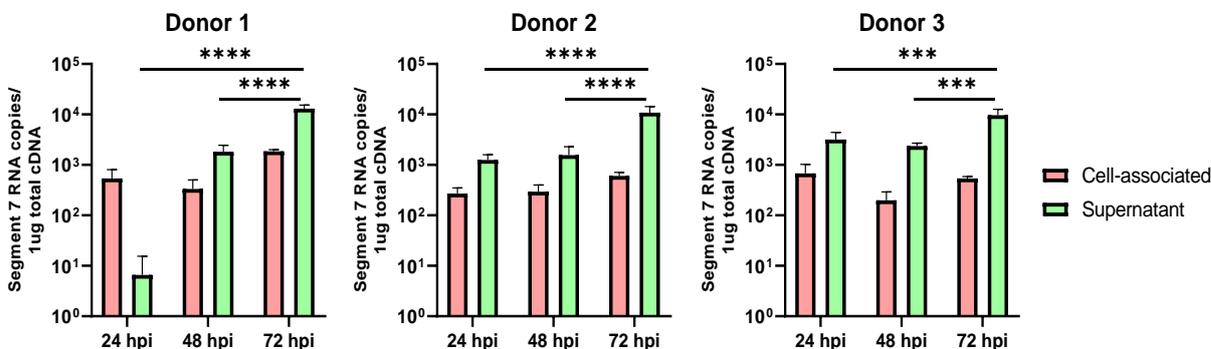


Figura 11: Linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico são pouco permissivos a replicação de IAV. Quantificação do número de cópias do segmento 7 do genoma de IAV nas células e sobrenadantes de culturas de linfócitos T CD8⁺, nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Infecção realizada com MOI=1. Teste estatístico: Two-way ANOVA.

4.6 A infecção por IAV de linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico induz aumento na produção de citocinas

Com o objetivo de entender melhor o estado da função efetora de linfócitos T CD8⁺ infectados por IAV buscou-se avaliar a produção de citocinas por essas células. Os gráficos a seguir evidenciam a produção das citocinas IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-6 e IL-10 por linfócitos T CD8⁺ infectados ou não infectados (Mock) no tempo de 72 hpi. A expressão está representada por *Fold change* calculada com base nas situações Mock e, avaliando as três situações, é possível observar que há aumento significativo na produção das citocinas pesquisadas nas células infectadas de todos os doadores, de modo que os linfócitos dos doadores 1 e 3 aumentaram em níveis semelhantes, enquanto que do doador 2 aumentou aproximadamente 11 vezes mais (Figura 12). Estes resultados indicam que a infecção *in vitro* por IAV altera parte da função efetora dessas células, aumentando a produção de citocinas, tanto inflamatórias quanto anti- inflamatórias.

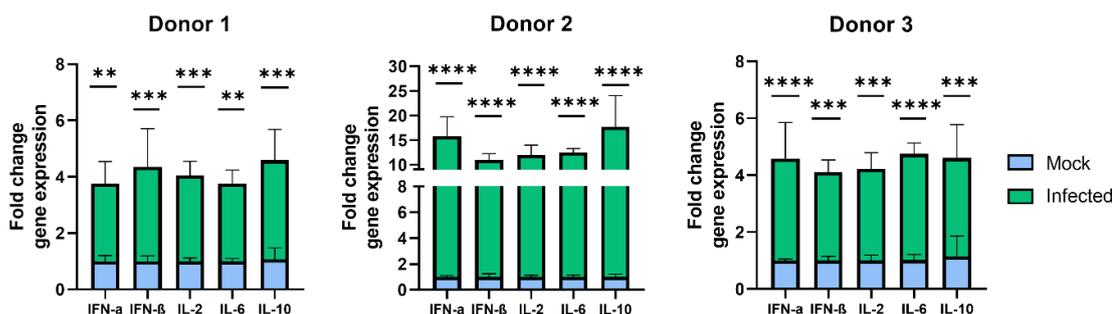


Figura 12: A infecção por IAV de linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico induz aumento na produção de citocinas. Expressão das citocinas IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-6 e IL-10 - em Fold change - por linfócitos T CD8⁺ infectados ou não infectados (Mock) no tempo de 72 hpi. Infecção realizada com MOI=1. Teste estatístico: Two-way ANOVA.

4.7 A expressão do fator de transcrição T-bet em linfócitos T CD8⁺ não é alterada pela infecção por IAV

T-bet (ou Tbx21) é um fator de transcrição que está envolvido na diferenciação de linfócitos T CD8⁺ em células efetoras [Kallies & Good Jacobson, 2017; Joshi et al, 2007]. Com o objetivo de verificar se a infecção interfere na expressão de T-bet e entender melhor a função efetora dessas células, ensaios de citometria foram realizados para linfócitos T CD8⁺ derivados do sangue de 7 doadores saudáveis, representados na Figura 13. Em (C) as frequências de células T-bet⁺ apresentaram-se iguais nas situações MOCK e infectada por IAV em ambos os tempos de infecção, indicando que todas as culturas avaliadas possuem níveis iguais de expressão de T-bet. Em (D) está representada a expressão de T-bet somente em células NP⁺ nas situações que foram infectadas com IAV. Há diferença significativa na porcentagem de células NP⁺T-bet⁺ em relação às NP⁺T-bet⁻, sugerindo que IAV infecta preferencialmente células T-bet⁻. No entanto, é importante ressaltar que a expressão de T-bet é pequena em todas as situações, como representado em (C).

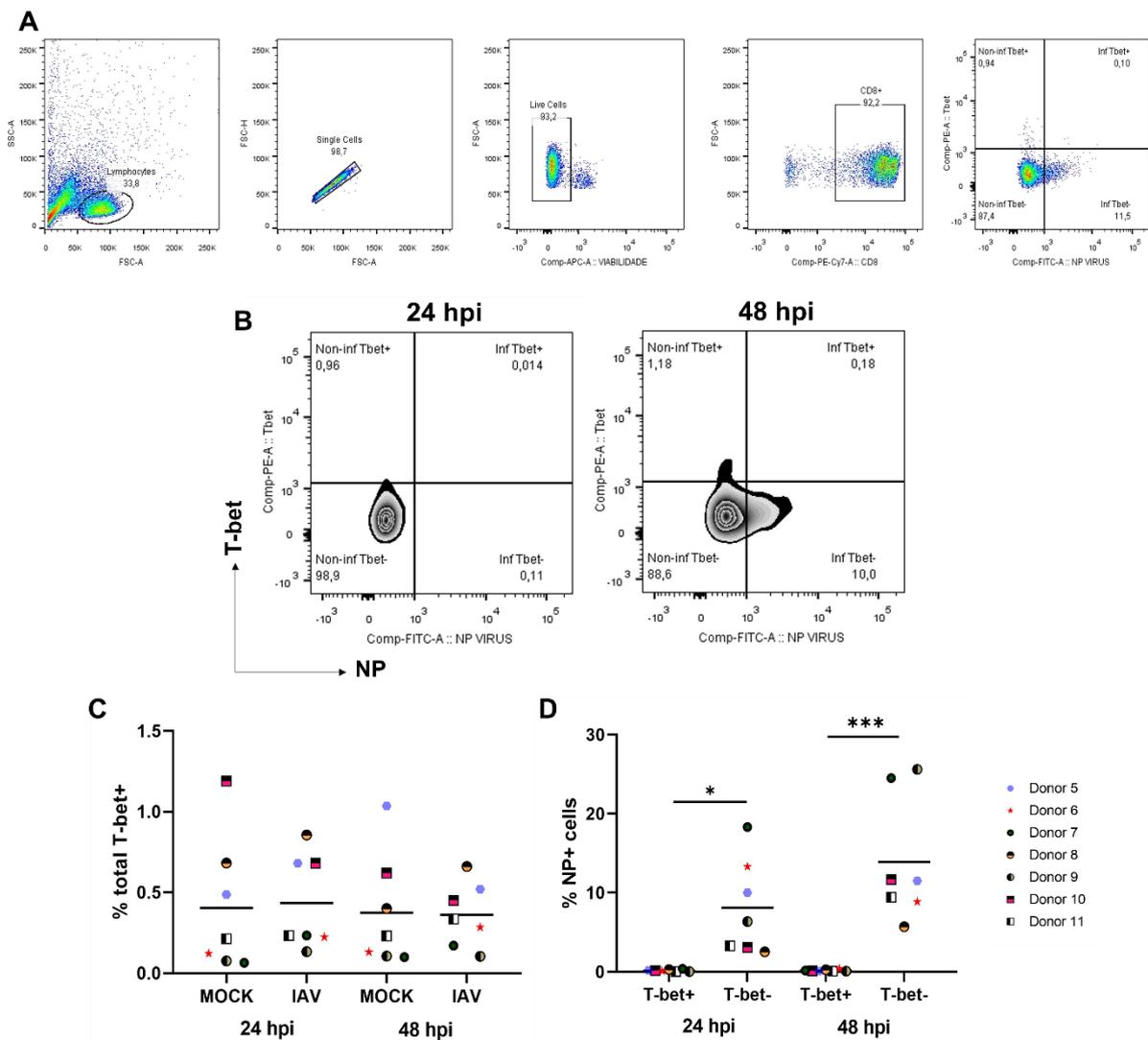
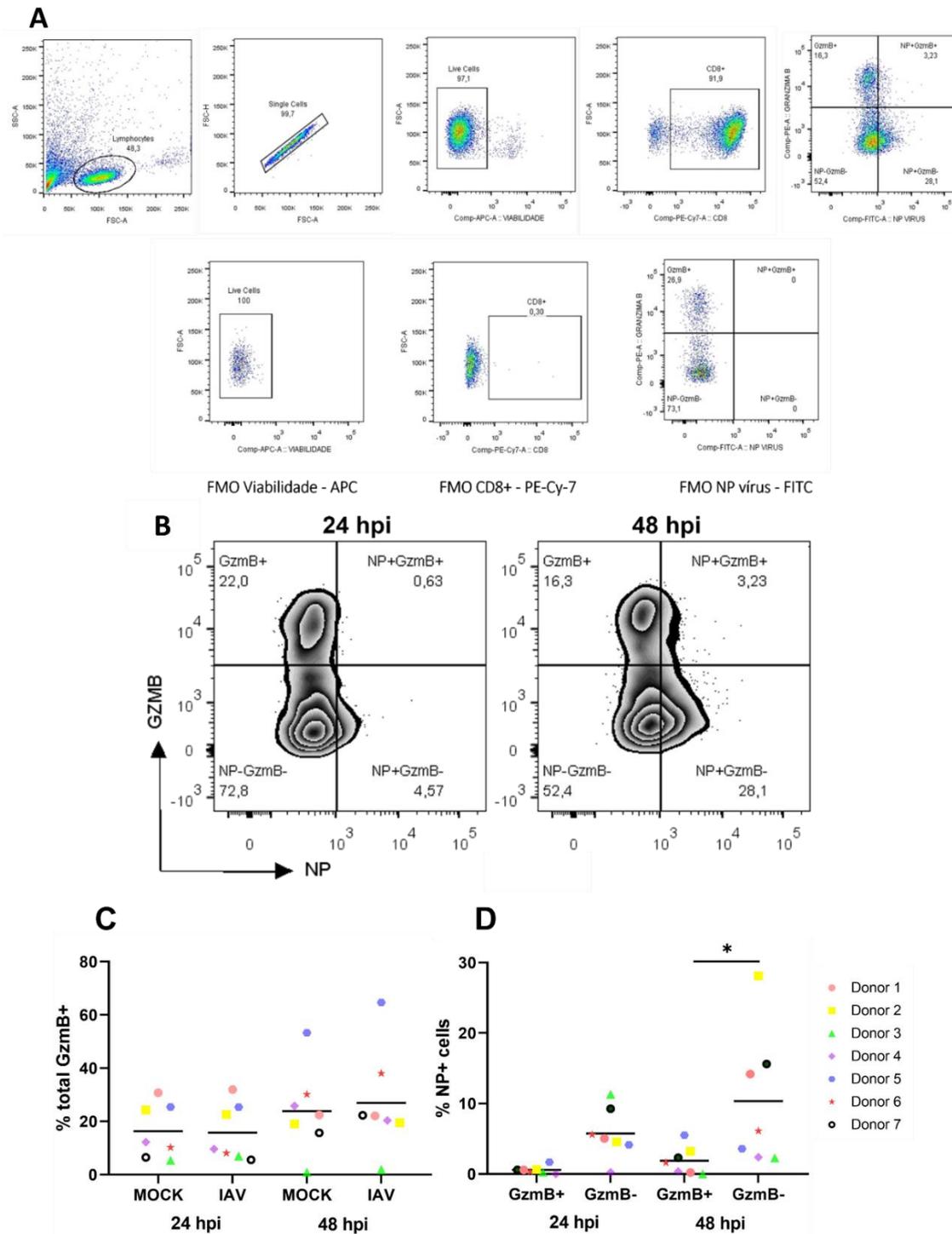


Figura 13: A expressão do fator de transcrição Tbet não é alterada pela infecção por IAV. (A) *Layouts* representativos da estratégia de *gating* para separação de linfócitos, células únicas, células vivas, linfócitos T CD8⁺ e marcação para NP e Tbet, respectivamente. (B) *Dotplot* representativo da expressão de Tbet. (C) Expressão total de Tbet em linfócitos T CD8⁺ nas situações MOCK e infectada com IAV, nos tempos de 24 e 48 hpi. (D) Porcentagem de células NP⁺ em que há ou não a expressão de Tbet (Tbet⁺ e Tbet⁻, respectivamente), nos tempos de 24 e 48 hpi. Teste estatístico: One-way ANOVA.

4.8 A infecção de linfócitos T CD8⁺ por IAV não altera a expressão de granzima B

A principal função efetora de linfócitos T CD8⁺ na imunidade adaptativa é a indução da morte de células-alvo específicas para a morte via apoptose. A identificação da célula-alvo ocorre por meio do reconhecimento de um antígeno específico em sua superfície pelo TCR do linfócito T CD8⁺ citotóxico, que desencadeia a formação da sinapse imunológica e liberação dos grânulos citotóxicos, que contêm granzima B. A fim de verificar se a infecção de linfócitos T CD8⁺ por IAV prejudica a expressão de granzima B, células derivadas do sangue de 7

doadores saudáveis foram infectadas com IAV e avaliadas por meio de citometria de fluxo. Em (C) a expressão de granzima B total apresenta-se igual nas culturas MOCK e infectada, nos tempos de 24 e 48 hpi, indicando que não há expressão diferencial desta proteína ao comparar as situações. Em (D) observa-se que no tempo de 48 hpi os linfócitos T CD8+ infectados por IAV são em sua maioria GZMB-, sugerindo que IAV infecta mais efetivamente linfócitos não efetores.



5. DISCUSSÃO

A infecção natural de linfócitos T CD8⁺ humanos por IAV, conforme observado por Castro et al., 2020 é algo muito surpreendente já que este tipo celular é um dos principais efetores da imunidade adaptativa contra infecções virais. Investigar as características da infecção e a função efetora das células infectadas é essencial para entender quais os possíveis efeitos de uma infecção em células de defesa, se pode ser ou não prejudicial para que os linfócitos T CD8⁺ desempenhem seu papel de morte as células-alvo. Dessa forma, o presente estudo baseia-se na infecção *in vitro* de linfócitos T CD8⁺ humanos a fim de melhor compreensão das questões levantadas.

Linfócitos T CD8⁺ tonsilares também são infectados por IAV *ex vivo*, como evidenciado pela imunomarcagem da proteína estrutural NP. Uma característica interessante desta infecção é a formação de aglomerados de células, que são observados tanto em campo claro quanto em fluorescência. Esses aglomerados em formato de roseta possivelmente são formados por meio da interação entre proteínas HA virais expressas na superfície da membrana de células infectadas, e grupos de ácidos siálicos da superfície de células adjacentes, que podem ou não estar infectadas com IAV. Mecanismo semelhante ao processo de hemaglutinação, em que os vírus se ligam às hemácias por meio das mesmas interações [Killian, 2014]. A infecção *in vitro* de linfócitos T CD8⁺ humanos não se restringe a células tonsilares, mas ocorre também em células do sangue periférico, em que igualmente observa-se a formação de aglomerados de células.

A quantificação de RNA viral por qRT-PCR de linfócitos tonsilares evidencia que as cargas de IAV são maiores no sobrenadante do que no ambiente intracelular em todos os tempos avaliados, e que as cargas intracelulares não se alteram com o decorrer do tempo. Além disso, no sobrenadante da cultura tonsilar há aumento da carga viral em 48 hpi e diminuição em 72 hpi. Esses dados são intrigantes pois a ausência de alteração no ambiente intracelular e o aumento de carga no sobrenadante levantam questões de como o vírus está se replicando e de onde ele está sendo liberado.

A quantificação de RNA viral de linfócitos T CD8⁺ do sangue é semelhante àquela encontrada em linfócitos tonsilares, incluindo os títulos virais alcançados. No entanto, existem algumas diferenças observadas. No tempo de 24 hpi da cultura do doador 1, a carga viral é maior nos linfócitos em comparação ao seu sobrenadante. Além disso, não é observada diminuição na carga viral em 72 hpi nos sobrenadantes das culturas. Essa última característica sugere a ideia de que o ciclo replicativo do IAV em linfócitos T CD8⁺ do sangue ocorre de

forma mais lenta ou que essas células possuem uma maquinaria celular mais efetiva em comparação às células tonsilares. Estas últimas, como mostrado por Proença-Modena et al. em 2012, podem estar em estados mais exauridos devido à exposição a um maior número de agentes virais. Da mesma forma como observado para linfócitos tonsilares, não há correspondência entre o aumento da carga viral intracelular e no sobrenadante.

A marcação de células NP⁺ por citometria de fluxo de linfócitos T CD8⁺ obtidos do sangue de 10 doadores revela que a susceptibilidade a infecção por IAV tem grande variação de acordo com o indivíduo. De forma geral, a porcentagem de células infectadas é maior no tempo de 48 hpi em relação ao tempo de 24 hpi. No entanto, é no tempo de 48 hpi em que se observa grande variação na taxa de infecção dentre os doadores: 31,33% dos linfócitos T CD8⁺ do doador 2 estão infectados por IAV, enquanto 14,41% do doador 1 e 5,96% do doador 8 estão infectados.

A expressão das citocinas IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-6 e IL-10 é aumentada em linfócitos T CD8⁺ infectados por IAV em comparação aos linfócitos Mock. É importante ressaltar que o aumento observado para o doador 2 é mais intenso em comparação aos doadores 1 e 3, chegando a ser aproximadamente 11 vezes maior. Essa diferença é notável, especialmente considerando que o doador 2 também apresenta uma maior porcentagem de células infectadas em comparação aos outros doadores. Esses resultados sugerem uma possível relação entre a alta susceptibilidade dos linfócitos T CD8⁺ do doador 2 e uma maior capacidade de resposta destas células.

IFN- α , IFN- β e IL-6 são citocinas inflamatórias: IFN- α e IFN- β possuem papel na resposta a infecções virais [Talemi & Hofer, 2018], enquanto IL-6 é tem um papel mais genérico na indução de resposta inflamatória [Velazques-Salinas et al., 2019]. Já IL-2 é uma citocina regulatória produzida principalmente por linfócitos T e atua na proliferação dessas células [Damoiseaux, 2020]. Por outro lado, IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória que controla a produção de citocinas inflamatórias e modula a resposta imune [Bedke et al., 2019]. O aumento na produção de citocinas, incluindo as inflamatórias, regulatórias e anti-inflamatórias, não se enquadra em um perfil de resposta Th1, Th2 ou qualquer outro perfil específico. Essa resposta não indica um perfil de resposta direcionado. Em vez disso, sugere-se que esse aumento ocorre como uma resposta mais geral à infecção, sem especificamente indicar um combate direto à infecção ou uma tentativa de eliminar os linfócitos. No entanto, é notável como a infecção está impactando a expressão dessas citocinas.

O fator de transcrição T-bet está envolvido tanto no direcionamento da diferenciação de linfócitos T CD8⁺ para o estado de células efetoras, quanto na expressão de genes efetores pelos CTLs após diferenciação [Kallies & Good Jacobson, 2017]. A infecção de linfócitos T CD8⁺ por IAV não altera os níveis de expressão de T-bet, o que sugere que IAV não interfere neste nível de regulação transcricional. Ao avaliar a expressão de T-bet em células infectadas NP⁺, observa-se que células infectadas são T-bet⁻, que podem ser células *naive*, que ainda não passaram pelo processo de diferenciação, ou células exaustas, que já passaram. No entanto, tanto na situação Mock quanto na infectada, os níveis de expressão de T-bet são baixos. Portanto, além da possibilidade de o IAV infectar preferencialmente células T-bet⁻, também é possível que haja uma baixa expressão de T-bet em linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico.

Partindo da observação de que não há redução nos níveis de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ deficientes em T-bet, estudos conduzidos por Intleklofer et al., 2008 revelaram que omeostermina, um outro fator de transcrição, exerce funções comuns a T-bet no estímulo da produção de IFN- γ e outras moléculas citotóxicas em linfócitos T CD8⁺. Além disso, Xin et al., 2016 demonstrou também que Blimp-1, um outro fator de transcrição, induz a expressão das granzimas B e C pelos CTLs. Essas descobertas evidenciam que o papel de T-bet não é exclusivo e existem outros fatores de transcrição que desempenham um papel coordenado nesse processo tão importante dos CTLs.

A principal função efetora de linfócitos T CD8⁺ na imunidade adaptativa é a indução da morte de células-alvo específicas para a morte via apoptose desencadeada pela liberação de grânulos citotóxicos contendo granzimas e perforinas. A quantificação da expressão de granzima B por citometria de fluxo evidencia que a infecção de linfócitos T CD8⁺ por IAV não altera a produção de granzima B, diferentemente do que foi observado no estudo de Liu et al., 2021, em que linfócitos T CD8⁺ infectados *in vivo* com hantavírus produzem níveis alterados de perforina e granzima durante as diferentes fases da doença. No entanto, é importante ressaltar que o estudo atual é conduzido em um sistema isolado, que não considera o microambiente e a interação com outras células que ocorre em um organismo vivo e certamente interferem nas respostas celulares. Além disso, observa-se também que com 48 hpi IAV aparece infectando, em sua maioria, linfócitos T CD8⁺ GZMB⁻, sugerindo que este é o tipo celular preferencial para infecção.

O presente estudo teve como objetivo aprofundar nossa compreensão sobre as características da infecção de linfócitos T CD8⁺ humanos pelo IAV, que desempenham um papel crucial na defesa do organismo contra patógenos intracelulares. Embora não tenham sido

observadas alterações nos níveis de T-bet e granzima B, é importante ressaltar que as mudanças nos níveis de citocinas podem ter impactos significativos quando ocorrem no contexto do organismo vivo.

6. CONCLUSÃO

Com base no presente estudo apresentado pode-se concluir que linfócitos T CD8+ tonsilares e derivados do sangue periférico são susceptíveis a infecção *in vitro* por IAV, porém pouco permissivos. A susceptibilidade dos linfócitos T CD8+ varia de acordo com o indivíduo. Além disso, é importante destacar que as citocinas IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-6 e IL-10 apresentam um aumento significativo após a infecção por IAV, variando em escala de acordo com o indivíduo. Essas alterações não ocorrem para a expressão do fator de transcrição T-bet e da molécula efetora granzima B.

7. REFERÊNCIAS

- Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew J; Pillai, Shiv. Rio de Janeiro; Elsevier; 8. ed; 2015. 536 p.
- ADAMS, Nicholas M.; GRASSMANN, Simon; SUN, Joseph C. Clonal expansion of innate and adaptive lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 11, p. 694-707, 2020.
- BANERJEE, Indranil et al. High-content analysis of sequential events during the early phase of influenza A virus infection. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e68450, 2013
- BEDKE, Tanja et al. IL-10-producing T cells and their dual functions. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2019. p. 101335.
- BEDI, Sukhmani; ONO, Akira. Friend or foe: the role of the cytoskeleton in influenza A virus assembly. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 46, 2019.
- BOUVIER, Nicole M.; PALESE, Peter. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 26, p. D49-D53, 2008.
- BUZZELL, Anne; HANIG, Martin. The mechanism of hemagglutination by influenza virus. In: **Advances in virus research**. Academic Press, 1958. p. 289-346.
- CASTRO, Italo A. et al. Silent infection of B and CD8+ T lymphocytes by influenza A virus in children with tonsillar hypertrophy. **Journal of virology**, v. 94, n. 9, 2020.
- CHAPMAN, Nicole M.; BOOTHBY, Mark R.; CHI, Hongbo. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 1, p. 55-70, 2020.
- DAMOISEAUX, Jan. The IL-2–IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor. **Clinical Immunology**, v. 218, p. 108515, 2020.
- DE VLUGT, Corey; SIKORA, Dorota; PELCHAT, Martin. Insight into influenza: a virus cap-snatching. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 641, 2018.
- FONTANA, J.; STEVEN, A. C. Influenza virus-mediated membrane fusion : Structural insights from electron microscopy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 581, p. 86–97, 2015.
- GBD. Influenza Collaborators. Mortality, morbidity, and hospitalisations due to influenza lower respiratory tract infections, 2017: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med*. 2019; 7(1): 69–89.
- HAO, Wenzhuo; WANG, Lingyan; LI, Shitao. Roles of the non-structural proteins of influenza A virus. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 812, 2020.
- IBRICEVIC, Aida et al. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. **Journal of virology**, v. 80, n. 15, p. 7469-7480, 2006.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus taxonomy: 2023 release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy>
- INTLEKOFER, Andrew M. et al. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and comsodermin. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 408-411, 2008.
- IULIANO, A. D. et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. **The Lancet**, v. 391, n. 10127, p. 1285–1300, 2018.
- JAVANIAN, Mostafa et al. A brief review of influenza virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 8, p. 4638-4646, 2021.

- JOSHI, Nikhil S. et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁺ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. **Immunity**, v. 27, n. 2, p. 281-295, 2007.
- JUNG, Hi Eun; LEE, Heung Kyu. Host protective immune responses against influenza A virus infection. **Viruses**, v. 12, n. 5, p. 504, 2020.
- KAECH, Susan M.; CUI, Weiguo. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 749-761, 2012.
- KALLIES, Axel; GOOD-JACOBSON, Kim L. Transcription factor T-bet orchestrates lineage development and function in the immune system. **Trends in immunology**, v. 38, n. 4, p. 287-297, 2017.
- KILLIAN, Mary Lea. Hemagglutination assay for influenza virus. **Animal influenza virus**, p. 3-9, 2014.
- Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 509(4): 3.
- LIU, Rongrong et al.. HTNV infection of CD8⁺ T cells is associated with disease progression in HFRS patients. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 652, 2021.
- POHL, M. O.; LANZ, C.; STERTZ, S. Late stages of the influenza A virus replication cycle — a tight interplay between virus and host. **Journal of General Virology**, p. 2058–2072, 2016.
- PROENCA-MODENA, Jose Luiz et al. High rates of detection of respiratory viruses in tonsillar tissues from children with chronic adenotonsillar disease. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42136, 2012.
- RELLO, Jordi; POP-VICAS, Aurora. Clinical review: primary influenza viral pneumonia. **Critical Care**, v. 13, n. 6, p. 1-6, 2009.
- ROSSMAN, J. S.; LAMB, R. A. Influenza virus assembly and budding. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 229–236, 2011.
- SHAW, M. L.; PALESE, P. Orthomyxoviridae: The Viruses and their Replication. **Fields Virol. 6th Ed.** [S.l.: s.n.], 2013.
- SIMONS, Karin H. et al. T cell co-stimulation and co-inhibition in cardiovascular disease: a double-edged sword. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 6, p. 325-343, 2019.
- SURH, Charles D.; SPRENT, Jonathan. Homeostasis of naive and memory T cells. **Immunity**, v. 29, n. 6, p. 848-862, 2008.
- TALEMI, Soheil Rastgou; HÖFER, Thomas. Antiviral interferon response at single-cell resolution. **Immunological reviews**, v. 285, n. 1, p. 72-80, 2018.
- Van Kempen M, Rijkers GT, Van Cauwenberge PB. The Immune Response in Adenoids and Tonsils. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000; 122(1): 8–19.
- VELAZQUEZ-SALINAS, Lauro et al. The role of interleukin 6 during viral infections. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1057, 2019.
- VERDON, Daniel J.; MULAZZANI, Matthias; JENKINS, Misty R. Cellular and molecular mechanisms of CD8⁺ T cell differentiation, dysfunction and exhaustion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7357, 2020.
- WATANABE, Y. et al. The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 11–20, 2012.
- WEBSTER, R. G.; GOVORKOVA, E. A. Continuing challenges in influenza. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, n. 1, p. 115–139, 2014.
- WRIGHT, P.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P. (Org.). **Fields Virol. 6th Ed.** 6th edition ed. [S.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 1151–1185.

YAMADA, S. et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 378–382, 2006.

XIN, Annie et al. A molecular threshold for effector CD8⁺ T cell differentiation controlled by transcription factors Blimp-1 and T-bet. **Nature immunology**, v. 17, n. 4, p. 422-432, 2016.