

GISLANE DE ALMEIDA SANTOS

EXPRESSÃO DE CD39 EM LEUCÓCITOS INFILTRANTES DO PULMÃO
ATENUA A HIPERINFLAMAÇÃO E NECROSE PULMONAR DURANTE A
TUBERCULOSE EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

São Paulo, 2022

GISLANE DE ALMEIDA SANTOS

EXPRESSÃO DE CD39 EM LEUCÓCITOS INFILTRANTES DO PULMÃO
ATENUA A HIPERINFLAMAÇÃO E NECROSE PULMONAR DURANTE A
TUBERCULOSE EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Maria Regina D'Império Lima

Coorientadora: Elena Lassounskaia

Versão original

São Paulo, 2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Almeida Santos, Gislane
EXPRESSÃO DE CD39 EM LEUCÓCITOS INFILTRANTES DO
PULMÃO ATENUA A HIPERINFLAMAÇÃO E NECROSE PULMONAR
DURANTE A TUBERCULOSE EM CAMUNDONGOS / Gislane de
Almeida Santos; orientadora Maria Regina
D'Império Lima; coorientadora Elena Lassounskaia. -
- São Paulo, 2022.
114 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Tuberculose. 2. Sinalização purinérgica. 3.
CD39. 4. Necrose. 5. Inflamação. I. D'Império Lima,
Maria Regina, orientador. II. Lassounskaia, Elena,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gislane de Almeida Santos

Título da Dissertação/Tese: Expressão de CD39 em leucócitos infiltrantes do pulmão atenua a hiperinflamação e necrose pulmonar durante a tuberculose em camundongos

Orientador: Prof^a. Dr^a Maria Regina D'Império Lima

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o (a) candidato(a):

Aprovado (a)

Reprovado (a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel dos receptores A2A e A2B na modulação da resposta inflamatória e geração de linfócitos T residentes de memória pulmonares na tuberculose experimental", protocolada sob o CEUA nº 3185080318, sob a responsabilidade de **Maria Regina D'Imperio Lima e equipe; Gislane de Almeida Santos; Paula Carolina de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 15/06/2018.

We certify that the proposal "Role of A2A and A2B receptors in the modulation of inflammatory response and generation of resident pulmonary memory T lymphocytes in experimental tuberculosis", utilizing 1850 Isogenics mice (1850 males), protocol number CEUA 3185080318, under the responsibility of **Maria Regina D'Imperio Lima and team; Gislane de Almeida Santos; Paula Carolina de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 06/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: C57BL6		N amostral: 350	
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: C57BL/6 CD4 KO		N amostral: 800	
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: C57BL/6 CD8 KO		N amostral: 475	
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: C57/BL 6 A2A KO		N amostral: 75	
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: C57BL/6 A2B KO		N amostral: 75	
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas	
Linhagem: C57BL/6 45.1		N amostral: 75	

São Paulo, 23 de maio de 2021



Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

São Paulo, 07 de junho de 2021
CEUA N 3185080318

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Maria Regina D'imperio Lima
Área: Imunologia

Título da proposta: "Papel dos receptores A2A e A2B na modulação da resposta inflamatória e geração de linfócitos T residentes de memória pulmonares na tuberculose experimental".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 001547)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 23/abril/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: " Para avaliar a função da CD39 na regulação purinérgica da resposta inflamatória pulmonar à infecção por Mycobacterium tuberculosis (Mtb), camundongos CD39 KO, camundongos C57BL/6 e camundongos CD4 KO serão submetidos aos mesmos procedimentos já descritos no projeto em vigência, sendo: Utilização do modelo experimental murino de tuberculose associada a hiperinflamação e patologia necrótica no pulmão (ALMEIDA, 2017; AMARAL, 2014) através da infecção dos camundongos com a cepa hipervirulenta Mtb M299 e cepa virulenta de referência Mtb H37Rv. Os camundongos CD4 KO receberão transferência adotiva de células T CD4 isoladas de camundongos CD39 KO e C57BL/6 naïves 7 dias após a infecção. Após 28 dias de infecção os camundongos serão eutanasiados e o pulmão será coletado para análise do infiltrado celular, carga bacteriana e análise histopatológica. Alternativamente, serão utilizados camundongos CD39 KO/FOXP3 GFP obtidos a partir do cruzamento de animais transgênicos FOXP3 GFP com animais CD39 KO. Estes animais serão utilizados para isolamento de TCD4 regulatórias por cell sorting para avaliar o efeito da ausência de CD39 especificamente em células T regulatórias. Para o cruzamento desta linhagem serão necessários 5 animais CD39 KO fêmeas e 5 machos, assim como 5 C57BL/6 FOXP3 GFP machos e 5 fêmeas. Desse total de animais, serão formados 3 casais CD39 KO/FOXP3 GFP para produção da geração F1, a qual será toda heterozigota. A geração F1 será cruzada novamente entre si para obtenção da geração F2 a qual possui parte de homozigotos e parte de heterozigotos. Neste contexto, será feita a genotipagem dessa geração para encontrar os animais homozigotos duplo transgênicos CD39 KO/FOXP3 GFP. Estes sim serão mais uma vez acasalados e mantidos para a experimentação. Os outros 2 casais FOXP3 GFP e os 2 casais de CD39 KO serão mantidos para obtenção de controles caso seja necessário para os experimentos. Ao decorrer do projeto com a dificuldade de obtenção de camundongos A2A e A2B, que foi ainda mais prejudicada pelo curso da pandemia, os alguns dos objetivos delimitados para utilização destes camundongos foram suspensos. Desta forma, uma vez que o curso dos objetivos do projeto foram alterados e os experimentos com transferência adotiva de células TCD4 isoladas de camundongos A2A e A2B para camundongos CD4 KO não foram realizados, não será necessária a inclusão de novos camundongos CD4 KO para a realização dos novos experimentos, por este motivo, os camundongos CD4 KO constarão no delineamento experimental da nova proposta em anexo, mas não aparecerão na solicitação de alteração do número de animais. Após desmame e genotipagem, os animais não utilizados provenientes dos cruzamentos serão eutanasiados seguindo os protocolos já aprovados e descritos no projeto em vigência."

Comentário da CEUA: "A CEUA autoriza a inclusão de 125 camundongos machos C57BL/6, 130 camundongos machos CD57BL/6 CD39 KO, 5 camundongos fêmeas CD57BL/6 CD39 KO, 30 camundongos machos C57BL/6 FOXP3 GFP e 5 camundongos fêmeas C57BL/6 FOXP3 GFP provenientes do Biotério do Departamento de Imunologia no projeto CEUA N° 3185080318."



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 072.2021 – CEUA 626

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da função da CD39 na modulação da resposta inflamatória durante a tuberculose pulmonar experimental**”, registrada com o nº **626**, sob a responsabilidade do pesquisador Gislane de Almeida Santos, , sob a orientação do Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **05 de novembro de 2021**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/11/2021 a 31/09/2023
Espécie/Linhagem	Camundongo <i>Mus musculus</i> / CD39KO
Número de animais	75
Sexo	Macho
Peso/Idade	20 gramas / 06-08 semanas
Origem	Biotério do Departamento de Imunologia/ICB
Espécie/Linhagem	Camundongo <i>Mus musculus</i> / C57BL/6
Número de animais	75
Sexo	Macho
Peso/Idade	20 gramas / 06-08 semanas
Origem	Biotério do Departamento de Imunologia/ICB
Espécie/Linhagem	Camundongo <i>Mus musculus</i> / CD4KO
Número de animais	90
Sexo	Macho
Peso/Idade	20 gramas / 06-08 semanas
Origem	Biotério do Departamento de Imunologia/ICB

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

Ressaltamos que, após o período de término do projeto de pesquisa, nenhum ensaio poderá ser realizado.

São Paulo, 05 de novembro de 2021

Profa. Dr. Irene Satiko Kikuchi
Coordenadora CEUA/FCF/USP



Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

REITORIA
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 482, intitulado “ESTUDO DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, SUA COINFEÇÃO COM OUTROS PATÓGENOS EMERGENTES, E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO ADJUVANTE DA TUBERCULOSE PULMONAR NO MODELO MURINO” sob a responsabilidade da Dr.^a Elena Lassounskaia, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11. 794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 25/05/2021 como um aditivo ao protocolo nº 350. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 25/05/2025.

Campos dos Goytacazes, 25 de maio de 2025.

Clóvis de Paula Santos

Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais



Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
Tel.: (22) 2739-4178 - (22) – 2739-7180 correio eletrônico: adrianafaria@uenf.br

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ser minha força e meu porto seguro em todos os momentos;

Aos meus pais Jorge e Eliane e meu irmão George por serem a razão pelo qual me mantenho firme rumo realização dos meus sonhos e objetivos;

Ao meu namorado Joaquim, por ser um excelente amigo e companheiro que me apoia em tudo tanto na vida pessoal, quanto profissional;

Aos meus amigos e colegas de laboratório Bruna, Déborah e Paulo por toda a amizade e suporte emocional durante o doutorado. Eu não sei se conseguiria chegar até aqui sem vocês. Vou sentir muitas saudades dos nossos passeios e idas na gelateria depois do expediente;

Aos meus amigos Caio e Igor que foram não só o time que me ajudou em todos os meus experimentos no NB3, mas também amigos que deram apoio e suporte e tornaram mais leves e divertidos os nossos cansativos experimentos. Diversas das coisas difíceis que tive que enfrentar durante o doutorado, só foram possíveis porque enfrentei junto com vocês. Só quem viveu sabe hahaha;

Ao meu amigo e mentor Fabrício por continuar me ajudando, mesmo não estando mais no mesmo lab. Você foi muito importante para eu estar aqui hoje. Enquanto diversas pessoas me disseram que eu não teria capacidade para passar em um doutorado na USP, você me encorajou e me deu forças para que eu tentasse. Nunca vou me esquecer disso. Ainda bem que decidi te ouvir. Tive extrema sorte de poder sido treinada e coorientada por você na graduação e mestrado. Isso definitivamente contribuiu para eu saber que tipo de cientista e mentora eu quero ser no futuro;

À minha coorientadora Prof. Elena que abriu as portas para que eu começasse a engatinhar no mundo científico. Quando eu entrei no seu laboratório para fazer iniciação científica eu tive a certeza ali de que eu queria ser cientista. Uma vez, ainda na IC eu disse para a senhora que queria ser igual a senhora quando fosse professora e a senhora me disse que não queria que eu fosse igual a senhora, queria que eu fosse melhor. Isso me marcou profundamente porque só ilustra o

quanto a senhora é uma excelente mentora e orientadora, que sempre estimulou e apoiou meu crescimento como cientista;

Minha orientadora Prof. Maria Regina, por ter me dado a oportunidade de realizar o doutorado em seu laboratório. Uma vez a senhora me disse que toda vez que alguém quer vir para o lab sob sua orientação, a senhora imagina como um sim pode mudar a vida daquela pessoa. O seu sim ao aceitar me orientar, mudou não somente a minha realidade como a realidade de toda a minha família. Para quem veio de onde eu vim, fazer um doutorado na USP parece ser algo muito distante e inalcançável, mas sua orientação permitiu que eu chegasse até aqui e alcançasse coisas inimagináveis. Muito obrigada por todo o apoio e mentoria, por me estimular a querer sempre o melhor e estar disposta a ajudar sempre com muita disponibilidade. Tive muita sorte em ter minha carreira científica moldada ao longo da minha vida acadêmica por duas mulheres incríveis que admiro muito como a senhora e a prof. Elena;

Ao Prof. José Maria (Pepe) por toda colaboração, ajuda e convívio durante esses quatro anos;

Aos demais colegas do laboratório de Imunologia das doenças infecciosas Maria, Raíssa, Rafael, Isabella, Paula, Érika, Danilo, Marcos, Luciana pelo convívio e discussões nos lab meetings durante esses anos;

Aos técnicos do departamento de Imunologia. Em especial ao Rogério, Silvana e Dona Áurea. Ao Rô, um agradecimento ainda mais especial, pois ele é uma pessoa e profissional que todo laboratório merecia ter. Enquanto algumas pessoas se recusaram a me ajudar, ele foi a primeira pessoa que se ofereceu a me ensinar algumas das técnicas que eu precisava aprender para desenvolver meu projeto. Rogério é um excelente profissional, sempre disponível para ajudar, não só aos membros do nosso lab, mas todo o departamento de Imuno;

À Joelcimar (Jô) e ao Mário, técnicos do CEFAP sempre muito solícitos e simpáticos com os usuários do citômetro e microscópio;

Às secretárias do departamento de Imunologia, em especial a Maria Eni secretária do PPG Imuno. Eni tem um coração gigante e sempre faz de um tudo para ajudar no que possível;

Aos professores do departamento de Imunologia que estão sempre disponíveis a emprestar reagentes ou disponibilizar o uso de seus equipamentos alunos do departamento quando necessário;

Aos nossos colaboradores, Dr. Mário Hirata, Dr. Simon Robson, Dr. Eduardo Pinheiro Amaral e Dr. José Carlos Farias Alves Filho, sou muito grata pelas contribuições de vocês neste trabalho;

A todos vocês, meu muito obrigada!

Dedico esta tese à minha avó, que infelizmente não conseguiu ver a neta virar “dotorá”, mas espero que a senhora esteja orgulhosa onde quer que esteja. Dedico também à minha família e a todos os meus professores que me estimularam a sempre ir em busca dos meus sonhos.

“Sejam quais forem os resultados com êxito ou não, o importante é que no final cada um possa dizer: ‘fiz o que pude’.”

Luis Pasteur

Trabalho realizado no laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas da Universidade de São Paulo, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Regina D'Império Lima (ICB-USP) e coorientação da Prof^a. Dr^a. Elena Lassounskaia (CBB-UENF). Projeto financiado pelo CNPq (processo nº 408909/2018-8) e FAPESP (processo nº 2015/20432-8) e realizado com bolsa CNPq (processo nº140666/2018-4).

RESUMO

A tuberculose (TB) grave está associada a uma condição altamente inflamatória que resulta em lesões necróticas no pulmão e disseminação bacteriana. O estímulo massivo de P2X7 mediada por adenosina trifosfato (ATP) em casos hiperinflamatórios agrava a pneumonia pulmonar e a necrose, contribuindo para a rápida progressão da doença. A CD39, uma proteína de membrana expressa por células imunes e endoteliais, fosforidrolisa ATP extracelular em adenosina difosfato (ADP) e ADP em adenosina monofosfato (AMP) para gerar adenosina (ADO). A atividade de ATPase da CD39 regula a função e morte das células imunes mediadas por P2X7 e induz respostas imunes regulatórias e supressoras através da geração de ADO. Assim, como um fator limitante entre o acúmulo de ATP e a geração de ADO, a CD39 pode moldar a qualidade da resposta imune. Neste estudo, avaliamos como a CD39 modula a resposta imune à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) hipervirulenta. Em nosso modelo de TB experimental em camundongos C57BL/6, foi observado que a CD39 é mais expressa por células imunes do que por células estruturais do pulmão e que sua expressão é upregulada em células imunes na fase aguda de infecção. Dentre as células imunes infiltradas no pulmão, macrófagos são as células que mais expressam CD39 no pulmão de animais infectados. A infecção de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) por Mtb *in vitro* mostra que os macrófagos derivados da medula óssea *Entpd1*^{-/-} são mais suscetíveis à morte celular e liberação extracelular de micobactérias. A deficiência de CD39 induz TB letal associada com extensas áreas de necrose e pneumonia em camundongos infectados com Mtb altamente virulenta. Mesmo em doses mais baixas de infecção, os camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados são mais susceptíveis à perda de peso corporal e possuem maior carga bacteriana nos pulmões comparados a camundongos C57BL/6. Extensas áreas necróticas com maior número de Mtb extracelular em camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados, indicam que a maior susceptibilidade de macrófagos à morte celular, somado ao aumento da migração de neutrófilos para o pulmão pode acarretar em progressão rápida das lesões necróticas. O aumento das lesões inflamatórias no fígado e remodelamento da morfologia do baço indicam que camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados são mais susceptíveis ao desenvolvimento de lesões extrapulmonares. Níveis elevados de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-6 e IFN- γ) nos pulmões indicam que camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados também são mais susceptíveis ao desenvolvimento do quadro hiperinflamatório. Estes resultados demonstram que a atividade ATPase do CD39 atenua a condição altamente inflamatória induzida pela infecção por Mtb, controlando o dano pulmonar e aumentando a sobrevivência do camundongo.

ABSTRACT

Severe tuberculosis (TB) is associated with a hyperinflammatory condition that results in necrotic lung lesions and bacterial spread. Massive adenosine triphosphate (ATP)-mediated P2X7 stimulation in hyperinflammatory cases exacerbates pulmonary pneumonia and necrosis, contributing to rapid disease progression. CD39, a membrane protein expressed by immune and endothelial cells, phosphohydrolase extracellular ATP to adenosine diphosphate (ADP) and ADP to adenosine monophosphate (AMP) to generate adenosine (ADO). CD39 ATPase activity regulates P2X7-mediated immune cell function and death and induces regulatory and suppressive immune responses through ADO generation. Thus, as a limiting factor between ATP accumulation and ADO generation, CD39 can shape the quality of the immune response. This study evaluated how CD39 modulates the immune response to hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection. We observe that in our experimental TB model in C57BL/6 mice, CD39 is more expressed by immune than by structural cells of the lung. Also, the CD39 expression is upregulated in immune cells in the acute phase of infection. Among the immune cells, macrophages are the cells that most express CD39 in the lungs of infected animals. The *in vitro* infection of bone marrow-derived macrophages (BMDM) by Mtb shows that *Entpd1*^{-/-} BMDMs are more susceptible to cell death and extracellular release of mycobacteria. CD39 deficiency induces lethal TB associated with extensive necrosis areas and pneumonia in mice infected with highly virulent Mtb. Even at lower doses of infection, *Entpd1*^{-/-} mice are more susceptible to body weight loss and have a higher bacterial load in the lungs compared to C57BL/6 mice. Extensive necrotic areas with greater numbers of extracellular Mtb in infected *Entpd1*^{-/-} mice indicate that the increased susceptibility of macrophages to cell death, added to the increased migration of neutrophils to the lung, can lead to rapid progression of necrotic lesions. The increased inflammatory lesions in the liver and spleen remodeling indicate that infected *Entpd1*^{-/-} mice are more susceptible to the development of extrapulmonary TB lesions. Elevated inflammatory cytokine and chemokine levels in the lungs indicate that infected *Entpd1*^{-/-} mice are also more susceptible to the development of the hyperinflammatory condition. These results demonstrate that CD39 ATPase activity attenuates the hyperinflammatory condition induced by Mtb infection, controlling lung damage and increasing mouse survival.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência mundial da tuberculose em 2020, (Global Tuberculosis Report, WHO, 2021).	27
Figura 2. Resposta imune durante a infecção por Mtb (O'garra et al., 2013)	29
Figura 3. Principais características da tuberculose: da infecção à defesa do hospedeiro (Kaufmann et al., 2001).	30
Figura 4. Estrutura e constituintes celulares do granuloma tuberculoso (Ramakrishnan et al., 2012)	31
Figura 5. Localização celular e função dos isotipos da E-NTPDase.	34
Figura 6. Proteínas de membrana e metabólitos da sinalização purinérgica (Eberhardt et al., 2022)	35
Figura 7. Papel dual do receptor P2RX7 na infecção por Mtb. (Eberhardt et al., 2022)	38
Figura 8. Avaliação da expressão das moléculas purinérgicas CD39, CD73 e P2X7 no pulmão de camundongos infectados.	51
Figura 9. Análise da expressão de CD39 em células imunes do pulmão durante o curso de infecção por Mtb altamente virulenta.	53
Figura 10. Avaliação da viabilidade de MDMOs após infecção com Mtb altamente virulenta.	54
Figura 11. Avaliação dos efeitos da deficiência de CD39 no aumento da morbidade dos camundongos infectados.	56
Figura 12. Avaliação dos efeitos da deficiência de CD39 em baixa dose de infecção por Mtb altamente virulenta.	58
Figura 13. Avaliação do efeito da deficiência de CD39 na resposta de células mielóides e produção de citocinas no pulmão de camundongos infectados.	60
Figura 14. Avaliação do efeito da deficiência de CD39 na resposta de células T no pulmão de camundongos infectados.	62
Figura 15. Visão geral das diferenças na resposta imune observada entre camundongos C57BL/6 e Entpd1^{-/-} (Feito com Biorender)	72
Figura 16. A inibição do receptor P2X7R previne a morte celular durante a digestão pulmonar e processamento para obtenção de suspensões celulares para Citometria de Fluxo.	85

Figura 17. Estratégia de análise de células mielóides e células T CD4+ e CD8+ em camundongos C57BL/6 e Entpd1^{-/-} infectados com a cepa M299.

..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACK - *Ammonium-Chloride-Potassium*

ADC - Albumina, Dextrose, Catalase

ADO - Adenosina

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BCG - bacilo de Calmette-Guérin

BMDM – *Bone marrow-derived macrophages*

Ca²⁺ - Cálcio

CCL - *C-C motif chemokine ligand*

CD – *Cluster differentiation*

CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais

CFSE - *Carboxifluoresceína succinimidil éster*

CXCL - *C-X-C motif chemokine ligand*

DAMPs - padrões moleculares associados à dano

DMEM/F-12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

eATP - ATP extracelular

E-NTPDases - nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases

GMFI - Média geométrica da intensidade de fluorescencia

HE - hematoxilina-eosina

HEPA - *High Efficiency Particulate Air*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

i.p. - Intraperitoneal

i.v. - Via intravenosa

IFN – *Interferon*

IGRAs - *Interferon-gamma release assays*

IL - *Interleucina*

Mbv - Mycobacterium bovis

MDMO – *Macrófagos derivados de medula óssea*

MHC - *Major histocompatibility complex*

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NLRP3 – *Nod like receptor 3*

p.i. – *pós-infecção*

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*

SFB - *Soro fetal bovino*

TB - *Tuberculose*

TB-MDR - *Tuberculose resistente a múltiplas drogas*

TCR - *receptor de células T*

TNF - *Tumor necrosis factor*

Tregs – *células T regulatórias*

tSNE - *t-distributed stochastic neighbor embedding*

UFC - *Unidades formadoras de colônias (UFC).*

ZN - *Ziehl Neelsen*

α - *Alfa*

β – *Beta*

γ – *Gama*

δ – *Delta*

SUMÁRIO

1. Introdução.....	25
1.1. A tuberculose	26
1.2. Epidemiologia da TB	27
1.3. Resposta imune ao Mtb	28
1.4. Sinalização purinérgica	32
1.5. Regulação da resposta imune mediada pela atividade de CD39.....	36
1.6. Sinalização purinérgica da resposta imune durante a TB	37
2. Objetivos.....	41
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos:	42
3. Material e métodos	43
4. Resultados.....	49
4.1. CD39 e P2X7 são mais expressos por células imunes comparado a células estruturais, mas apenas CD39 e CD73 são reguladas positivamente em células imunes durante a fase aguda de infecção por Mtb;	50
4.2. A expressão de CD39 é regulada positivamente no 28 ^o dia após infecção por Mtb altamente virulenta, sendo macrófagos as células que mais expressam CD39 no pulmão neste período de infecção	52
4.3. Macrófagos derivados de medula são mais suscetíveis à morte celular e liberam mais Mtb na ausência de expressão de CD39.....	54
4.4. Deficiência de CD39 induz tuberculose letal em camundongos infectados.....	55
4.5. Deficiência de CD39 culmina em maior perda de peso corpóreo, maior carga bacteriana, lesões necróticas e lesões extrapulmonares mesmo em baixas doses de infecção por Mtb.....	57
4.6. Deficiência de CD39 induz redução dos números de macrófagos e células dendríticas, aumento dos números de neutrófilos e monócitos e	

aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias no pulmão de camundongos infectados;	59
4.7. Deficiência de CD39 resulta em menor número de células T CD4 ⁺ naïves no pulmão e induz aumento da expressão de CD69 em células ativadas	61
5. Discussão	63
6. Conclusão.....	71
7. Referências.....	73
8. Apêndices	83
8.1. Apêndice A: A inibição do receptor P2X7R como estratégia para inibir a morte celular durante a digestão pulmonar e processamento para obtenção de suspensões celulares para citometria de Fluxo.	84
8.2. Apêndice B: Estratégia de análise da citometria de fluxo.....	86
8.3. Apêndice C: P2x7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis.....	88
8.4. Apêndice D: Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria	100

1.Introdução

1.1. A tuberculose

A TB é uma doença granulomatosa infectocontagiosa que afeta principalmente os pulmões (TB pulmonar), mas também afeta outros órgãos do corpo, como ossos, rins e olhos (TB extrapulmonar) (JAYACHANDRAN; SUNDARAMURTHY; COMBALUZIER; MUELLER *et al.*, 2007). O principal patógeno da tuberculose humana é o *Mtb*, entretanto a doença também pode ser causada por outras espécies de *Mycobacterium*, como *Mycobacterium bovis* (*Mbv*) e *Mycobacterium africanum* (KAUFMANN; BAUMANN; NASSER EDDINE, 2006) (KAUFMANN, 2006).

O *Mtb* é uma micobactéria de crescimento lento com um tempo de proliferação entre 12 a 24h em condições ideais. Uma característica importante do *Mtb* é a estrutura da parede celular, que fornece uma barreira impermeável excepcionalmente resistente à compostos nocivos e drogas, o que desempenha um papel fundamental para a virulência (DELOGU; SALI; FADDA). Os sistemas de secreção de proteínas também são fatores determinantes para a virulência de micobactérias patogênicas. Em *Mtb* foram identificados cinco sistemas de secreção do tipo 7 (ESX1-5), sendo o ESX1 o mais bem caracterizado dentre eles (ABDALLAH; GEY VAN PITTIUS; CHAMPION; COX *et al.*, 2007). O *Mtb* usa esse sistema de secreção ESX1 para se transportar do fagossomo para o citosol de macrófagos infectados, onde pode persistir em um ambiente protegido (ROMAGNOLI; ETNA; GIACOMINI; PARDINI *et al.*, 2012; VAN DER WEL; HAVA; HOUBEN; FLUITSMA *et al.*, 2007). ESX1 secreta entre muitos antígenos, ESAT-6 e CFP-10, duas pequenas proteínas altamente imunogênicas que são base dos *interferon-gamma release assays* (IGRAs), utilizados no diagnóstico imunológico da infecção por *Mtb* em humanos (DIEL; GOLETTI; FERRARA; BOTHAMLEY *et al.*, 2011).

Cepas modernas de *Mtb* como as do genótipo Beijing demonstraram possuir maior virulência do que micobactérias ancestrais. Em camundongos infectados com micobactérias modernas do genótipo Beijing, foi observada ampla lesão tecidual e baixa sobrevivência dos modelos animais comparado à camundongos infectados com cepas ancestrais deste genótipo (RIBEIRO; GOMES; AMARAL; ANDRADE *et al.*, 2014). Há ainda uma preocupação de que o genótipo de Beijing

possa ter uma predileção por desenvolver resistência a medicamentos (EBRAHIMI-RAD; BIFANI; MARTIN; KREMER et al., 2003).

1.2. Epidemiologia da TB

Apesar de ser uma doença curável e evitável, a TB continua sendo um grande problema de saúde pública, sendo considerada uma das principais causas de morte por um único patógeno em todo o mundo (ORGANIZATION, 2020). No ano de 2020, foram relatados cerca de 10 milhões de novos casos e aproximadamente 1,4 milhões de mortes globalmente (ORGANIZATION, 2020) (Figura 1).

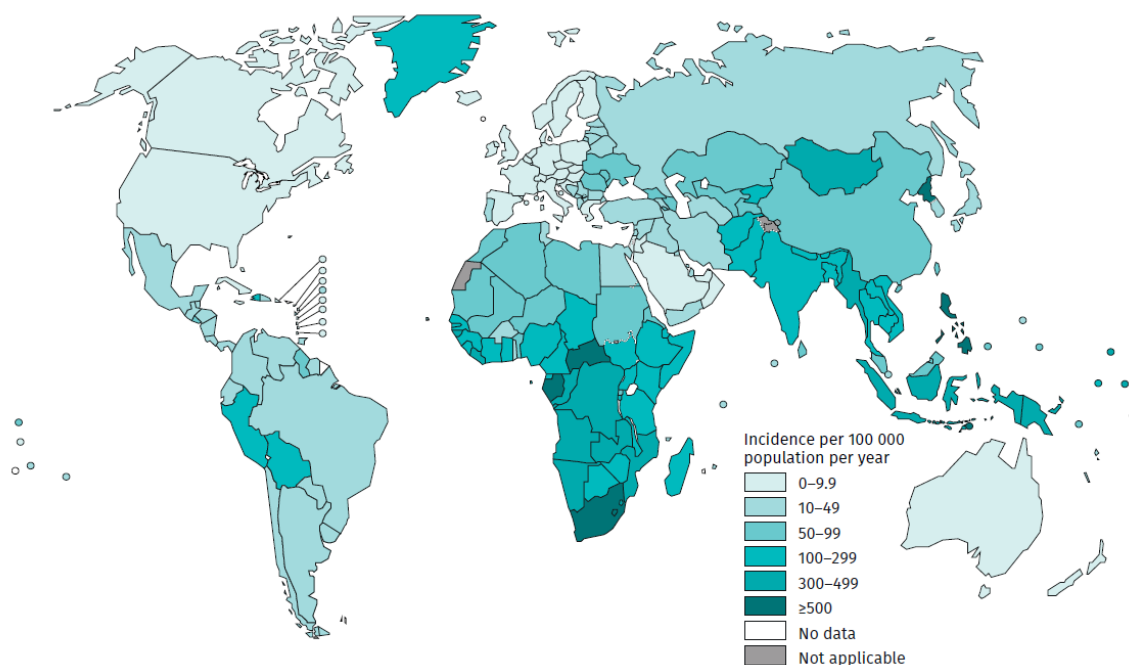


Figura 1. Incidência mundial da tuberculose em 2020, (Global Tuberculosis Report, WHO, 2021).

A alta incidência de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o surgimento de micobactérias resistentes a múltiplas drogas são alguns dos fatores que colaboram para o aumento da prevalência da doença (YOUNG; PERKINS; DUNCAN; BARRY, 2008). A vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin), cepa atenuada de *Mbv* é o método de prevenção mais utilizado. Apesar de proteger crianças e recém-nascidos contra as formas graves da TB primária, a vacina não previne a doença pulmonar em adultos de forma satisfatória e,

portanto, não contribui para a redução do número de pessoas acometidas pela doença mundialmente (KAUFMANN; HUSSEY; LAMBERT, 2010).

O tratamento é feito preferencialmente com um coquetel de três antibióticos (o coquetel- RIP) por um período de seis meses que inclui as drogas: Rifampicina (R), Isoniazida (I) e Pirazinamida (P). A esse coquetel pode ser adicionado o antibiótico Estreptomicina ou Etambutol, que também são drogas de primeira linha. Para tratar pacientes com TB resistente a múltiplas drogas (TB-RMD), são utilizadas drogas de segunda-linha, injetáveis, como Capreomicina, Canamicina ou Amicacina, e um grupo de fluoroquinolonas (por exemplo, Ciprofloxacina) que possuem maiores efeitos colaterais e devem ser administradas por mais tempo. Em casos de TB-RMD, as opções de tratamento são bastante limitadas (SACCHETTINI; RUBIN; FREUNDLICH, 2008), o que reforça a necessidade de elaboração de novas estratégias terapêuticas.

1.3. Resposta imune ao Mtb

O Mtb é transmitido pelo ar quando a pessoa com TB pulmonar ativa expele o bacilo junto com gotículas de saliva ao falar ou tossir. Uma pessoa saudável se infecta ao inalar as gotículas contendo os bacilos, que migram pelo trato respiratório até chegar aos alvéolos pulmonares, onde podem infectar ou serem eliminados por macrófagos alveolares, neutrófilos e células dendríticas (**Figura 2.1A/1B/1C**) (GRIFFITHS; NYSTRÖM; SABLE; KHULLER, 2010; KAUFMANN, 2012).

Até o início da imunidade adquirida, os macrófagos permanecem relativamente permissivos ao Mtb intracelular. Isso é identificado como um período de replicação bacteriana exponencial (RUSSELL; CARDONA; KIM; ALLAIN *et al.*, 2009). Os bacilos proliferam logaritmicamente nos macrófagos alveolares e células dendríticas e induzem a produção de mediadores inflamatórios tais como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 α e IL-1 β que ativam macrófagos e induzem a degradação da micobactéria (SCHAIBLE; STURGILL-KOSZYCKI; SCHLESINGER; RUSSELL, 1998). As células dendríticas ativadas migram para os linfonodos drenantes através dos vasos linfáticos e apresentam os antígenos micobacterianos para as células T (**Figura 2.2 e 2.3**) (GRIFFITHS; NYSTRÖM; SABLE; KHULLER, 2010).

As células T se ativam através da apresentação de antígenos de *Mtb* no MHC classe I e classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos. Uma vez ativados, os linfócitos efetores antígeno-específicos proliferam e adentram na circulação sanguínea. Estas células migram para as áreas primárias de infecção no pulmão 15-18 dias após a infecção, sinalizadas pela produção local de quimiocinas (REILEY; CALAYAG; WITTMER; HUNTINGTON *et al.*, 2008) (**Figura 2.4**).

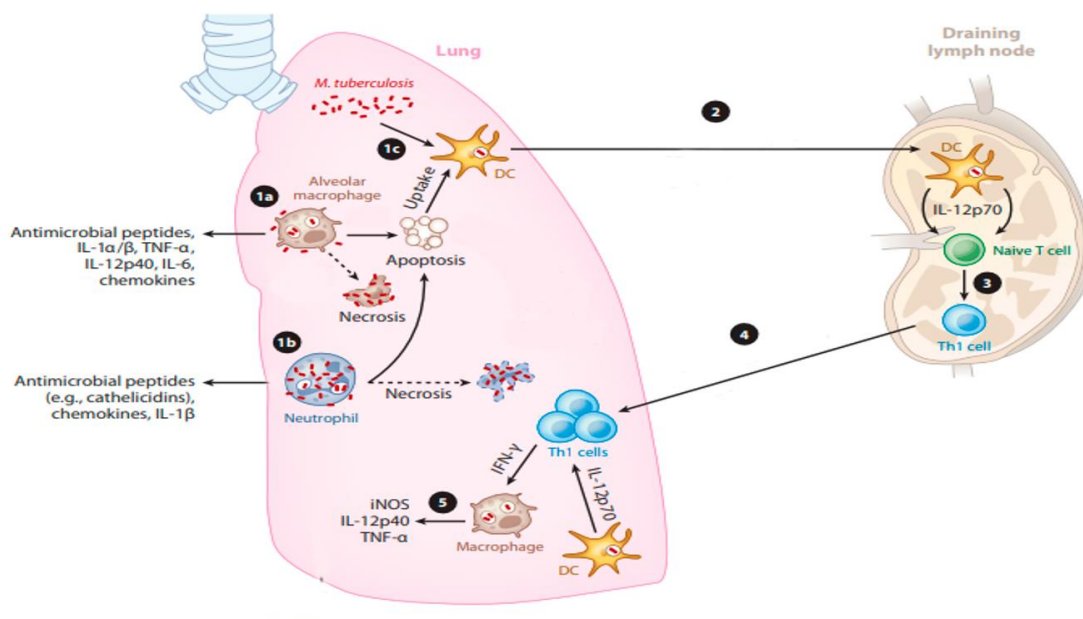


Figura 2. Resposta imune durante a infecção por *Mtb* (O'garra *et al.*, 2013)

Os linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$ T desempenham um papel importante na proteção contra a *Mtb* (KAUFMANN, 2001). As células T CD4⁺ produzem mediadores imunes como IFN- γ , linfotóxina alfa e IL-2 como estímulo autócrino para proliferação (ROACH; BRISCOE; SAUNDERS; FRANCE *et al.*, 2001). As células T CD8⁺ e as células $\gamma\delta$ T liberam granzimas e perforinas que exercem um efeito direto sobre os macrófagos infectados através de mecanismos independentes e dependentes de FasL. As células T reconhecem os antígenos de *Mtb* (ESAT-6 e *Mtb*-39) que estimulam a produção de IFN- γ e TNF- α (CACCAMO; SIRECI; MERAVIGLIA; DIELI *et al.*, 2006; FENHALLS; STEVENS; BEZUIDENHOUT; AMPHLETT *et al.*, 2002). O IFN- γ e o TNF- α produzidos pelos linfócitos T ativam macrófagos e potencializam a sua atividade microbicida, induzindo a eliminação do bacilo intracelular (**Figura 2.5 e Figura 3**) (KAUFMANN, 2001; PANDEY; SASSETTI, 2008).

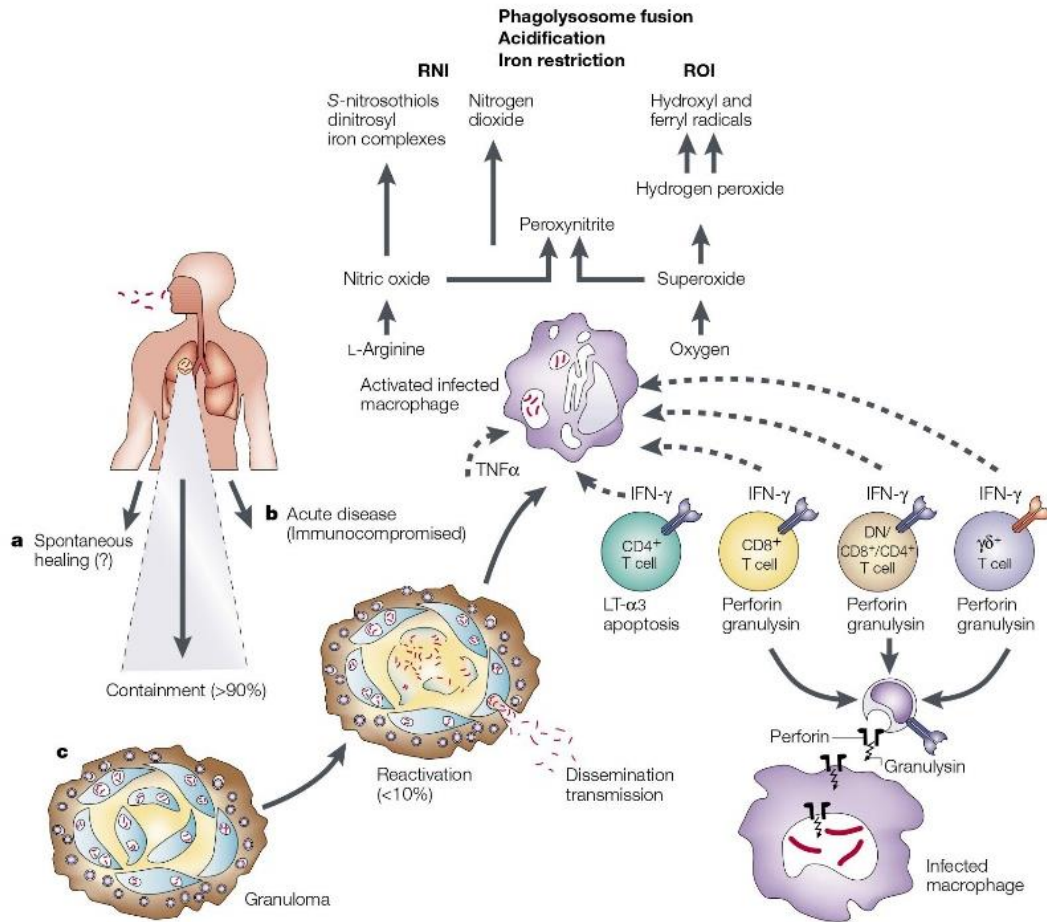


Figura 3. Principais características da tuberculose: da infecção à defesa do hospedeiro (Kaufmann et al., 2001).

O acúmulo de células imunes no foco da infecção inicia a formação do granuloma. A arquitetura do granuloma é caracterizada pela agregação de células T, neutrófilos, células epitelioides e macrófagos infectados que contêm a disseminação da Mtb, mantendo-a em um estado latente e impedindo sua propagação (**Figura 4**) (SAUNDERS; BRITTON, 2007; TSAI; CHAKRAVARTY; ZHU; XU *et al.*, 2006). A latência é considerada a marca registrada da imunidade protetora, atribuída classicamente à atividade coordenada das respostas das células T CD4⁺ e ao sucesso em aproximadamente 90% dos indivíduos infectados em controlar a disseminação das micobactérias (PHILIPS; ERNST, 2012).

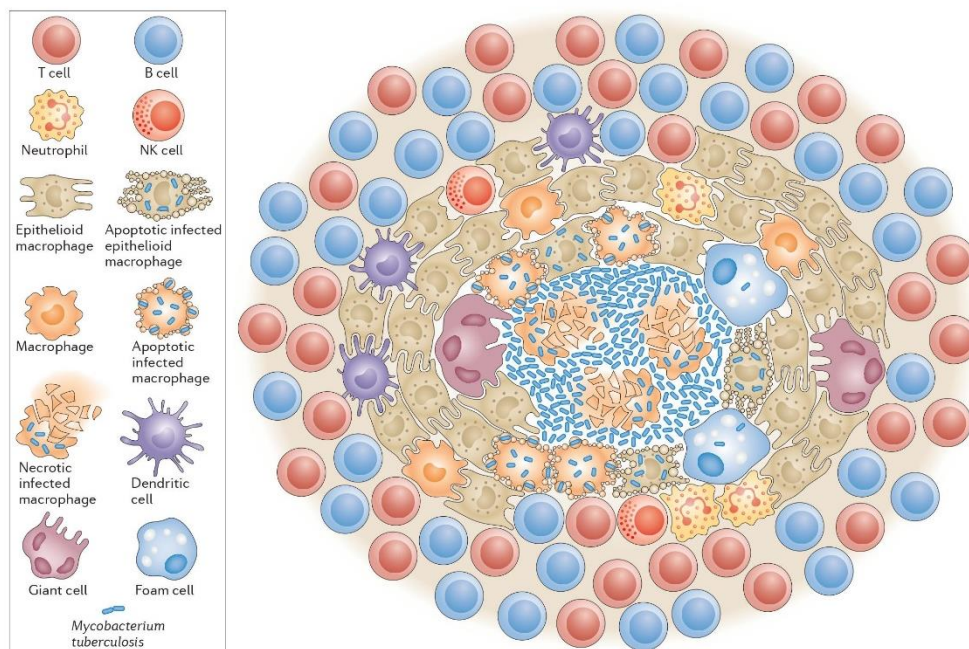


Figura 4. Estrutura e constituintes celulares do granuloma tuberculoso (Ramakrishnan et al., 2012)

Em humanos, na periferia de granulomas maduros são encontrados também fibroblastos associados às fibras de colágeno. A inflamação na TB é acompanhada do aumento do número de fibroblastos e da atividade fibroblástica (SHKURUPIY; KIM; POTAPOVA; CHERDANTSEVA *et al.*, 2014). Estas células produzem feixes de colágeno formando uma cápsula fibrótica que separa as bactérias do tecido circundante. Este processo é uma consequência da secreção de citocinas por células intragranulomatosas (AZOUZ; RAZZAQUE; EL-HALLAK; TAGUCHI, 2004). As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17 e IL-23 e quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 e CXCL10 possuem um papel fundamental, tanto para a formação e estabilidade do granuloma, quanto para o recrutamento de células inflamatórias para o foco da infecção (KHADER; BELL; PEARL; FOUNTAIN *et al.*, 2007; PETERS; ERNST, 2003; SAUNDERS; BRITTON, 2007).

A reativação da TB acontece em cerca de 5 a 10% da população infectada, devido a fatores como imunossupressão, que pode ser induzida por coinfeções como ocorre em alguns pacientes HIV-TB⁺, por exemplo. A infecção ativa avança devido à falha na resposta imunológica do hospedeiro em consequência ao comprometimento da resposta de células T nestes pacientes (CORBETT, 2003; KWAN; ERNST, 2011). Desta forma o granuloma não é capaz de conter a

infecção, ocorrendo uma rápida disseminação do Mtb através do tecido pulmonar. A rápida disseminação bacteriana contribui para necrose das células infectadas (BHATT; SALGAME, 2007). A liberação de padrões moleculares associados à dano (DAMPs) ou alarminas durante infecções podem potencializar a resposta inflamatória e migração de células imunes para o foco inflamatório (DI VIRGILIO, 2015; MCDONALD; PITTMAN; MENEZES; HIROTA *et al.*, 2010). A resposta inflamatória persistente pode levar a um quadro hiperinflamatório que agrava as lesões necróticas intragranulomatosas, contribuindo para uma rápida disseminação da doença (ALMEIDA; VENTURA; AMARAL; RIBEIRO *et al.*, 2017).

A pneumonia provocada pela inflamação exacerbada, juntamente com a necrose intragranulomatosa são descritos como fatores associados ao agravamento da TB pulmonar (DHEDA; BOOTH; HUGGETT; JOHNSON *et al.*, 2005; DORHOI; KAUFMANN, 2016). Esses fatores são as principais causas de mortalidade de adultos com tuberculose aguda não tratada. As lesões necróticas disseminadas contribuem para a perda de função pulmonar e fornecem um nicho seguro para as micobactérias, uma vez que limitam a penetração de leucócitos e antibióticos (ORME; ROBINSON; COOPER, 2015). Devido ao seu papel na disseminação bacteriana, bem como no dano tecidual, a necrose representa um potencial alvo terapêutico para intervenção na patogênese da TB (PAN; YAN; ROJAS; SHEBZUKHOV *et al.*, 2005)

1.4. Sinalização purinérgica

O ATP extracelular (eATP), liberado durante a necrose tecidual, também pode ser liberado para o meio extracelular durante o estresse celular, em condições inflamatórias ou de hipóxia, ou até mesmo através dos canais de panexina-1, após ativação celular (BODIN; BURNSTOCK, 2001). O ATP é a molécula que inicia a cascata de sinalização purinérgica e pode ser reconhecido por receptores purinérgicos do tipo P2, como P2X e P2Y (BURNSTOCK, 2007). Os receptores P2Y são acoplados à proteína G e modulam eventos de sinalização de mensageiros secundários (FAAS; SÁEZ; DE VOS, 2017). Já os receptores P2X são canais da membrana plasmática que medeiam o influxo ou efluxo de vários cátions, como a entrada Ca^{+2} . O receptor P2X7 se difere de todos os outros

subtipos P2X não apenas estruturalmente, mas também funcionalmente. O P2X7 possui sensibilidade de 10 a 100 vezes menor ao ATP, comparando aos demais receptores P2X. Isso sugere que o P2X7 funciona como um detector de “sinal de perigo” para altas concentrações de ATP que são liberadas durante o dano tecidual (LINDEN; KOCH-NOLTE; DAHL, 2019). O reconhecimento de eATP pelo receptor purinérgico P2X7 inicia uma variedade de cascatas de sinalização que desencadeiam eventos de ativação, migração, proliferação celular, produção de citocinas, dentre outros (ADINOLFI; PIZZIRANI; IDZKO; PANTHER *et al.*, 2005). A ativação de P2X7 não apenas abre um canal catiônico não seletivo, mas também medeia um aumento da permeabilidade da membrana formando o chamado “macroporo”, quando há um estímulo massivo e persistente. A formação destes macroporos na membrana celular também pode levar à morte celular induzida pelo do desequilíbrio osmótico (DI VIRGILIO; DAL BEN; SARTI; GIULIANI *et al.*, 2017).

A sinalização dos receptores purinérgicos por eATP pode ser regulada pela atividade de ectoenzimas purinérgicas. As ectoenzimas fosfohidrolizam o eATP em um processo enzimático de duas etapas para a geração de ADO, uma potente molécula anti-inflamatória e imunossupressora. A família das nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) compreende oito enzimas que têm como função hidrolisar ATP em adenosina difosfato (ADP) + Pi (fosfato), gerando monofosfatos de nucleotídeos (AMP) + Pi. Dentre as E-NTPDases a mais estudada é a ENTPD1, também conhecida como ecto-apyrase CD39 (ANTONIOLI; PACHER; VIZI; HASKO, 2013).

As E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 têm dois domínios que abrangem a membrana plasmática com um sítio ativo voltado para o meio extracelular (BIGONNESSE; LÉVESQUE; KUKULSKI; LECKA *et al.*, 2004). Em contraste, as NTPDases 4-7 estão ancoradas às membranas das organelas intracelulares por um (E-NTPDases 5 e 6) ou dois (E-NTPDases 4 e 7) domínios transmembranares e seu sítio catalítico está voltado para o lúmen de compartimentos intracelulares, como o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático (BIEDERBICK; KOSAN; KUNZ; ELSÄSSER, 2000; TROMBETTA; HELENIUS, 1999; WANG; GUIDOTTI, 1998; YEUNG; MULERO; MCGOWAN; BAJWA *et al.*, 2000) (**Figura 5**). Embora as E-NTPDases 5 e 6 possam estar presentes na superfície da membrana

plasmática e secretadas como enzimas solúveis após uma clivagem proteolítica, seus altos valores de Km e baixas atividades específicas tornam improvável que essas enzimas regulam a sinalização dos receptores P2 (BRAUN; FENGLER; EBELING; SERVOS *et al.*, 2000; HICKS-BERGER; CHADWICK; FRISCHAUF; KIRLEY, 2000; MULERO; YEUNG; NELKEN; FORD, 1999; TROMBETTA; HELENIUS, 1999).

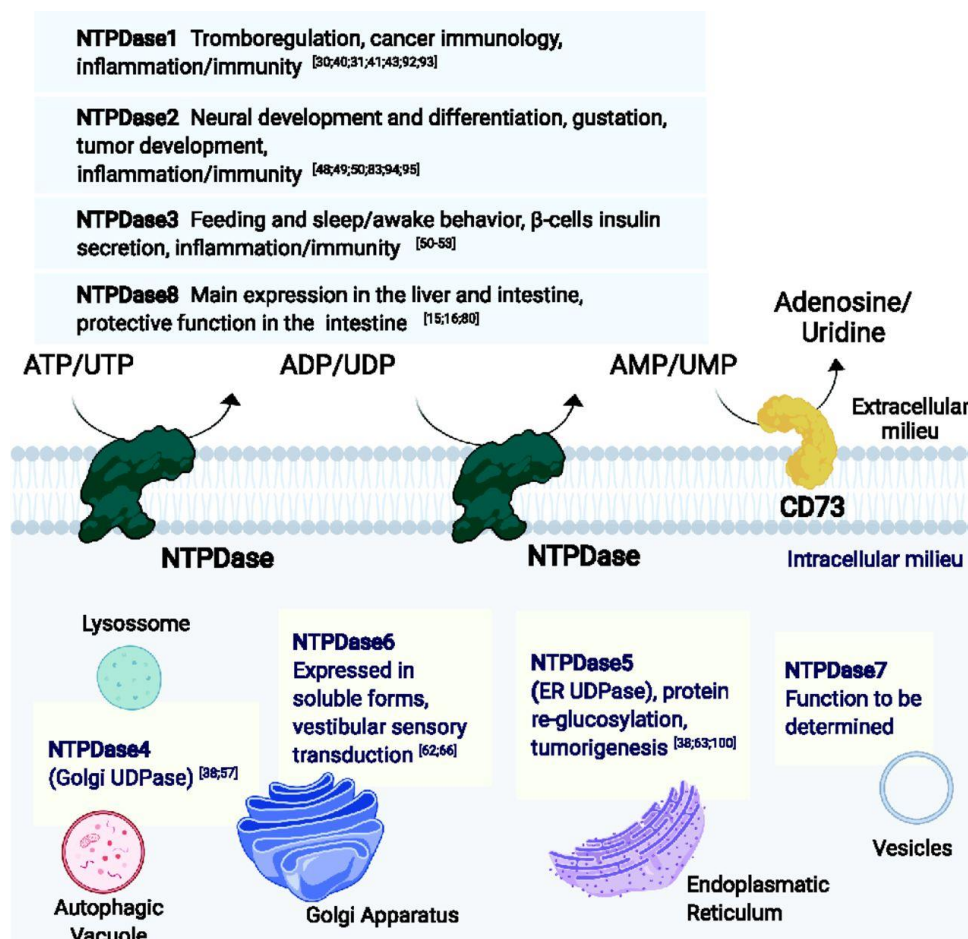


Figura 5. Localização celular e função dos isotipos da E-NTPDase. (Haas *et al.*, 2021)

As E-NTPDases ligadas à membrana plasmática possuem capacidade distinta de hidrólise dos nucleosídeos extracelulares. Enquanto a E-NTPD1 hidrolisa igualmente ATP e ADP (MARCUS; BROEKMAN; DROSOPOULOS; ISLAM *et al.*, 1997; WANG; GUIDOTTI, 1996), a E-NTPD2 hidroliza preferencialmente ATP (HEINE; BRAUN; HEILBRONN; ZIMMERMANN, 1999; MATEO; HARDEN; BOYER, 1999; VLAJKOVIC; HOUSLEY; GREENWOOD; THORNE, 1999). Já a E-NTPD3 e E-NTPD8 são intermediários funcionais entre as NTPDases 1 e 2

(BIGONNESSE; LÉVESQUE; KUKULSKI; LECKA *et al.*, 2004; SMITH; KIRLEY, 1998). Dentre as E-NTPDases ligadas à membrana plasmática, a E-NTPD1 é enzima que mais se distingue, pois desfosforila ATP diretamente em AMP sem o acúmulo de quantidades significativas de ADP. Esta propriedade evita amplamente a ativação de receptores P2Y por ADP (KUKULSKI; LÉVESQUE; LAVOIE; LECKA *et al.*, 2005) e torna a E-NTPD1 um fator limitante para a geração de ADO .

Outra enzima limitante para a geração de ADO é a ecto-5'-nucleotidase, também conhecida como CD73, que catalisa a degradação do AMP em ADO. Ao contrário do ATP, a adenosina possui propriedades imunorreguladoras, e o acúmulo desta molécula no meio extracelular tem mostrado efeito protetor sobre as células e tecidos, prevenindo uma resposta inflamatória excessiva (ANTONIOLI; BLANDIZZI; PACHER; HASKO, 2013; HASKÓ; CRONSTEIN, 2004) (**Figura 6**).

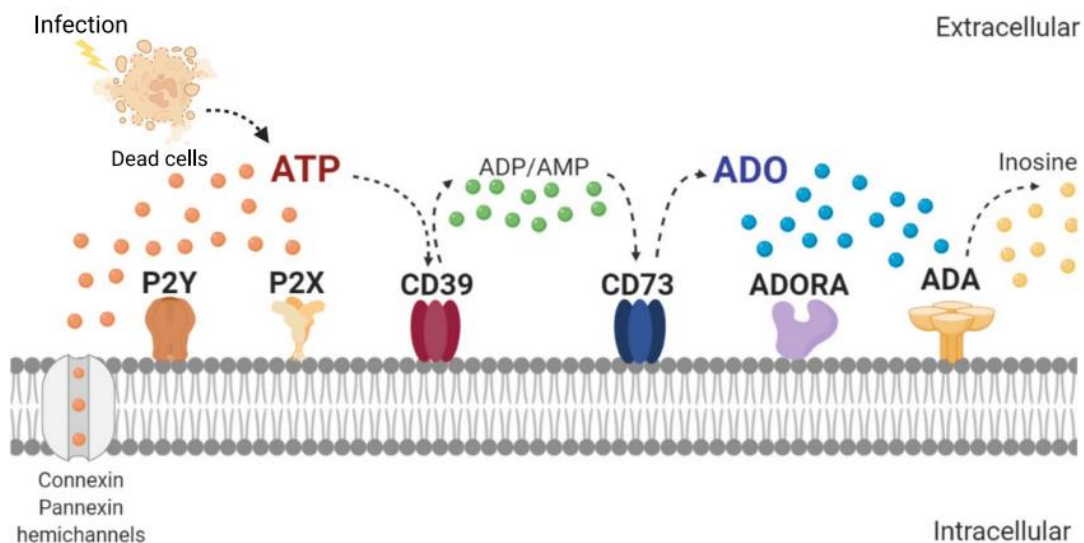


Figura 6. Proteínas de membrana e metabólitos da sinalização purinérgica (Eberhardt et al., 2022)

Foram descritos quatro subtipos de receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3), todos eles pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G. Eles podem ser encontrados em muitas células inflamatórias e estruturais no pulmão, mas também aparecem em vários outros órgãos, tornando desafiadora a compreensão dos efeitos da sinalização destes receptores no tecido pulmonar afetado pela infecção (FREDHOLM; AP; JACOBSON; KLOTZ *et al.*, 2001).

1.5. Regulação da resposta imune mediada pela atividade de CD39

A CD39 é expressa constitutivamente em células imunes como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T regulatórios (Tregs) (DWYER; DEAGLIO; GAO; FRIEDMAN *et al.*, 2007). Entretanto, sua expressão pode ser regulada positivamente em resposta a várias condições inflamatórias, como consequência da produção de citocinas inflamatórias, do estresse oxidativo e da hipóxia (CHALMIN; MIGNOT; BRUCHARD; CHEVRIAUX *et al.*, 2012; ELTZSCHIG; IBLA; FURUTA; LEONARD *et al.*, 2003; SYNNESTVEDT; FURUTA; COMERFORD; LOUIS *et al.*, 2002).

Por ser um importante fator limitante entre o acúmulo de eATP e geração de ADO, a CD39 pode modular a qualidade da resposta imune. Em células imunes a CD39 desempenha um papel complexo e importante na regulação de diferentes processos autócrinos e parácrinos executados por essas células. Em macrófagos com perfil pró-inflamatório (M1), a expressão e a atividade de CD39 são reduzidas, enquanto em macrófagos com perfil anti-inflamatório (M2), tanto sua expressão quanto atividade são aumentadas (ZANIN; BRAGANHOL; BERGAMIN; CAMPESATO *et al.*, 2012). Em macrófagos M1 e monócitos inflamatórios, a expressão de CD39 atua na regulação negativa das atividades mediadas pela sinalização por ATP, como secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-18 e TNF- α (LÉVESQUE; KUKULSKI; ENJYOJI; ROBSON *et al.*, 2010; PETROVIC-DJERGOVIC; HYMAN; RAY; BOUIS *et al.*, 2012). Em contraste, em macrófagos M2, a CD39 potencializa a atividade anti-inflamatória destas células, mediada pela geração de adenosina, induzindo aumento da produção de citocinas reguladoras IL-10 e IL-1Ra (CSÓKA; SELMECZY; KOSCSÓ; NÉMETH *et al.*, 2012).

Em neutrófilos, a expressão de CD39 está associada com a regulação da ativação (ELTZSCHIG; THOMPSON; KARHAUSEN; COTTA *et al.*, 2004; KUKULSKI; BAHRAMI; BEN YEBDRI; LECKA *et al.*, 2011), funções quimiotáticas (CORRIDEN; CHEN; INOUE; BELDI *et al.*, 2008; REUTERSHAN; VOLLMER; STARK; WAGNER *et al.*, 2009) e adesão ao endotélio vascular (ELTZSCHIG; WEISSMÜLLER; MAGER; ECKLE, 2006). Além disso, a rápida degradação de ATP pela CD39, que induz aumento das concentrações de

adenosina, leva a um efeito inibitório substancial que pode evitar potencial lesão tecidual decorrente de uma resposta inflamatória prolongada. A expressão de CD39 em células dendríticas está associada à regulação das atividades mediadas pelos receptores P2, essenciais para a função das células dendríticas, assim como à regulação da ativação de linfócitos T (ANTONIOLI; COLUCCI; LA MOTTA; TUCCORI *et al.*, 2012; MIZUMOTO; KUMAMOTO; ROBSON; SEVIGNY *et al.*, 2002). Apesar de expressar CD39 constitutivamente, as Tregs murinas exibem atividade aumentada desta molécula apenas após a ativação de seu receptor de células T (TCR), enquanto essa enzima foi considerada inativa em células não estimuladas (BORSELLINO; KLEINWIETFIELD; DI MITRI; STERNJAK *et al.*, 2007). Este aumento da atividade de metabolização do ATP parece ser crítico para a atividade imunossupressora das Tregs (ERNST; GARRISON; THOMPSON, 2010). Além disso, foi especulado que a atividade aumentada de CD39 permite a entrada dessas células em regiões inflamadas, onde reduz o nível extracelular de ATP, diminuindo assim a morte de células Treg mediada por P2X7 (BORSELLINO; KLEINWIETFIELD; DI MITRI; STERNJAK *et al.*, 2007).

1.6. Sinalização purinérgica da resposta imune durante a TB

A sinalização purinérgica tem demonstrado ser um importante modulador da resposta imune ao Mtb. Nosso grupo demonstrou recentemente que a expressão gênica de P2X7 é regulada positivamente em células do sangue periférico de pacientes com TB ativa, comparado à indivíduos saudáveis (SANTIAGO-CARVALHO; DE ALMEIDA-SANTOS; BOMFIM; DE SOUZA *et al.*, 2021). Além disso, também foi observado que a expressão proteica de P2X7 também é maior no pulmão de camundongos infectados durante a fase aguda de infecção, comparado a camundongos não infectados (SANTIAGO-CARVALHO; DE ALMEIDA-SANTOS; BOMFIM; DE SOUZA *et al.*, 2021). A ativação de P2X7 por eATP pode possuir um papel dual durante a tuberculose. Quando em baixos níveis, a ativação de P2X7 por eATP pode induzir a ativação de inflamassoma NLRP3 através de alterações iônicas citoplasmáticas induzidas pelo aumento do influxo de Ca^{2+} . A ativação do inflamassoma NLRP3 culmina na liberação de IL-1 β e IL-18 ativas que potencializam a resposta inflamatória (MARIATHASAN; WEISS; NEWTON; MCBRIDE *et al.*, 2006). Foi mostrado que o ATP extracelular

potencializa a ativação de macrófagos derivados de monócitos humanos infectados com baixa quantidade de bacilos da cepa virulenta de Mtb H37Rv, auxiliando na eliminação dos bacilos (DUBOIS-COLAS; PETIT-JENTREAU; BARREIRO; DURAND *et al.*, 2014).

Por outro lado, altos níveis de e ATP pode levar à ativação prolongada de P2X7, que induz a morte celular por necrose através do desequilíbrio osmótico devido à formação de poros na membrana celular (DI VIRGILIO; DAL BEN; SARTI; GIULIANI *et al.*, 2017). Nosso grupo demonstrou anteriormente que a sinalização de P2X7 em macrófagos por altas quantidades de ATP, possui um papel prejudicial para o desenvolvimento de formas graves de tuberculose pulmonar em camundongos (AMARAL; RIBEIRO; LANES; ALMEIDA *et al.*, 2014). Essa condição foi observada apenas na infecção por cepas micobacterianas hypervirulentas, que induzem uma inflamação exacerbada nos pulmões, mas não por cepas virulentas de Mtb, que induzem inflamação moderada, sugerindo que a sinalização de P2X7 por eATP potencializa a morte celular induzida pela infecção em condições altamente inflamatórias (**Figura 7**) (AMARAL; RIBEIRO; LANES; ALMEIDA *et al.*, 2014).

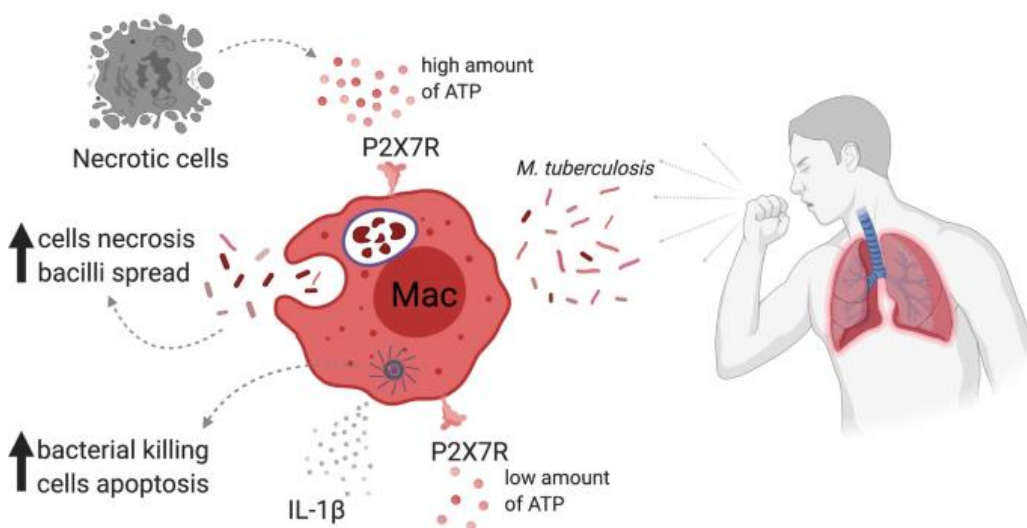


Figura 7. Papel dual do receptor P2RX7 na infecção por Mtb. (Eberhardt et al., 2022)

Em trabalhos seguintes, nosso grupo demonstrou que o agravamento da condição altamente inflamatória mediada pela sinalização por P2X7 estava ligada à expressão deste receptor em células derivadas da medula óssea (BOMFIM; AMARAL; CASSADO; SALLES *et al.*, 2017). Nosso grupo também

demonstrou que ao inibir a ativação de P2X7 durante a fase aguda da infecção por TB, há uma melhora da resposta imune gerando granulomas não necróticos melhor estruturados, que ajudam a controlar a disseminação bacteriana resultando em um melhor desfecho da doença em camundongos tratados (SANTIAGO-CARVALHO; DE ALMEIDA-SANTOS; BOMFIM; DE SOUZA *et al.*, 2021). Isso nos leva à hipótese de que a regulação negativa da sinalização do eATP pode ser importante para controlar o ciclo vicioso de morte celular e liberação de sinais de perigo que amplificam a resposta imune disfuncional e acelera a progressão da doença. Em contraste, outro trabalho do nosso grupo demonstrou que o acúmulo de adenosina impede a geração de células T CD4⁺ parenquimais protetoras contribuindo para o agravamento da TB severa em camundongos (AMARAL; MACHADO DE SALLES; BARBOSA BOMFIM; SALGADO *et al.*, 2019). Isso reforça o papel dual da sinalização do eixo ATP-adenosina na resposta imune durante a tuberculose severa em camundongos. Enquanto a atividade CD39 pode limitar os impactos prejudiciais mediados pela ativação massiva de P2X7 por eATP (SAVIO; DE ANDRADE MELLO; FIGLIUOLO; DE AVELAR ALMEIDA *et al.*, 2017), o microambiente supressor induzido pela geração de adenosina pode fornecer um nicho seguro para sobrevivência e replicação bacteriana nos macrófagos (NASCIMENTO; VIACAVAL; FERREIRA; DAMACENO *et al.*, 2021).

Em humanos tem sido proposto que a CD39 pode ser um importante regulador da resposta imune durante a infecção por Mtb. Em pacientes com TB pulmonar ativa, foi observado um aumento da população de células Treg (CD4⁺CD25^{high}CD39⁺) com propriedades reguladoras. A depleção de células Treg CD39⁺ aumentou significativamente as respostas de células T antígeno específicas para TB *in vitro* (CHIACCHIO; CASETTI; BUTERA; VANINI *et al.*, 2009). Também foi observado, que a CD39 medeia funções supressoras em células Treg CD8⁺ em pacientes com TB ativa (BOER; VAN MEIJGAARDEN; BASTID; OTTENHOFF *et al.*, 2013). Além disso, foi demonstrado que a presença de células T CD4⁺ reativas a antígenos de Mtb que expressam CD39 é mais abundante na TB ativa do que na TB latente e está associada à produção da citocina imunossupressora IL-10 (KIM; PERERA; TAN; FERNANDEZ *et al.*, 2014). Entretanto os efeitos da atividade de CD39 na imunopatologia pulmonar

durante a tuberculose não foram completamente compreendidos. Desta forma, compreender o papel da regulação da sinalização purinérgica pela CD39 durante a infecção por Mtb, pode auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na indução dos processos patológicos associados ao agravamento da tuberculose. Neste trabalho nós avaliamos o papel da CD39 na modulação da resposta inflamatória durante a tuberculose pulmonar em camundongos induzida por cepa altamente virulenta de Mtb.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Visando compreender os mecanismos patológicos associados à atividade de CD39 durante a TB severa, o objetivo geral deste trabalho é avaliar o papel da CD39 na regulação da resposta inflamatória à infecção pela cepa altamente virulenta Mtb Beijing M299 em modelo experimental de tuberculose pulmonar.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a expressão das moléculas purinérgicas CD39, CD73 e P2X7 em células imunes e estruturais do pulmão de camundongos C57BL/6;
- Avaliar a expressão de CD39 durante o curso de infecção por Mtb altamente virulenta;
- Avaliar como a deficiência de CD39 pode afetar a resposta de MDMO à infecção por Mtb altamente virulenta;
- Avaliar como a deficiência de CD39 impacta no desenvolvimento da patologia pulmonar durante a infecção por Mtb altamente virulenta;
- Avaliar como a deficiência de CD39 afeta a resposta de células imunes no pulmão de camundongos infectados por Mtb altamente virulenta.

3. Material e métodos

3.1. Camundongos

Camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} machos (6-8 semanas de idade) livres de patógenos específicos foram criados no biotério de camundongos isogênicos, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Após a infecção, os camundongos foram mantidos em gaiolas micro isoladoras com filtros HEPA no Laboratório de Biossegurança Nível 3, FCF-USP. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os regulamentos nacionais das diretrizes éticas para experimentação em camundongos sob autorização do Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) (CEUA ICB nº 3185080318, CEUA FCF nº 626, CEUA UENF nº482/2021).

3.2. Micobactérias e infecção

A cepa altamente virulenta de Mtb M299 Beijing, isolada de um paciente com tuberculose na província de Maputo, Moçambique, foi gentilmente cedida pelo Dr. Philip Suffys (Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). Alíquotas congeladas foram descongeladas e cultivadas em meio Middlebrook 7H9 enriquecido com 10% (vol/vol) de ADC (albumina, dextrose, catalase) (Difco, BD Biosciences, EUA) e 0,05% (vol/vol) de Tween 80 (Sigma-Aldrich). A cultura micobacteriana foi mantida a 37° C por 7 dias em agitação constante. Após atingir a fase Log de crescimento, as suspensões bacterianas foram sonicadas em banho-maria e agitadas por 1 minuto para dispersar os grumos. As densidades das suspensões bacterianas foram determinadas em espectrofotômetro a 600 nm.

3.3. Procedimento de infecção dos camundongos

Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com cetamina (Vetbrands, Brasil; 100 mg / kg) e xilazina (Vetbrands; 15 mg / kg) e infectados intratraquealmente (i.t.) 200 ou com 100 (dose baixa) bacilos da cepa altamente virulenta Mtb Beijing (ALMEIDA; VENTURA; AMARAL; RIBEIRO *et al.*, 2017).

3.4. Inibição de P2X7R para prevenir morte celular durante processamento do pulmão

Diversos estudos descrevem que a inibição direta ou indireta da atividade do P2X7R preserva a viabilidade celular durante o processamento do tecido sob a

digestão com a colagenase do tipo IV (BORGES DA SILVA; WANG; QIAN; HOGQUIST *et al.*, 2019; RISSIEK; LUKOWIAK; RACZKOWSKI; MAGNUS *et al.*, 2018). Para prevenir a morte celular durante a digestão pulmonar e processamento para obter suspensões celulares para citometria de fluxo, padronizamos o tratamento em que camundongos infectados foram injetados por via intravenosa com *Brilliant Blue G* (BBG, Sigma-Aldrich), um inibidor de receptores P2X (45 mg/Kg) 30 minutos antes da eutanásia por via intravenosa (i.v.) (Apêndice 1A). As diferenças em número e frequência de células viáveis recuperadas de camundongos infectados tratados e não tratados são mostradas nos Apêndice1B-G.

3.5. Isolamento e contagem de células infiltradas no pulmão

Os lobos pulmonares dissecados foram lavados com PBS 1x estéril, fragmentados e digeridos com solução de colagenase do tipo IV (0,5 mg / mL, Sigma-Aldrich) e DNase pancreática bovina tipo I (Roche Diagnostics; 1 mg / ml) em meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) a 37° C por 40 minutos sob agitação (200 rpm) (ALMEIDA; VENTURA; AMARAL; RIBEIRO *et al.*, 2017). Após digestão enzimática, os fragmentos de pulmão não dissociados filtrados em filtro de células com poros de 100 µm para obtenção das suspensões celulares. Alíquotas do homogenato pulmonar foram coletadas para posterior quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC). O homogenato celular foi centrifugado e o *pellet* de células foi incubado em tampão de lise ACK (Thermo Fisher Scientific, EUA) em temperatura ambiente por um minuto para depletar os eritrócitos. Após lise dos eritrócitos, as células foram ressuspensas em PBS com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos. A viabilidade das células pulmonares foi determinada usando um ensaio de exclusão por incorporação de *Trypan blue* durante a contagem em hemocítômetro.

3.6. Análise fenotípica das células infiltradas no pulmão

As células isoladas do pulmão foram plaquedas (1×10^6 células/poço) em placas de 96 poços de fundo redondo e marcadas com a sonda de viabilidade celular *Live and Dead* (Thermo Fisher Scientific) por 15 minutos a 4°C. Em seguida, as células pulmonares foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados à

fluorocromos (tabela 1) (BD Biosciences) por 30 minutos a 4°C. Após marcação as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos a 4°C e lavadas em tampão de citometria. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD Biosciences - EUA) e a análise dos dados foi realizada no software FlowJo 10.6.4 (BD Biosciences). A estratégia para análise de células mielóides e linfócitos T é mostrada no Apêndice 2 A, B.

Molécula	Clone	Fluorocromo	
CD11b	M1/70	V500	
CD11c	N418	APC-Cy7	
CD39	24DMS1	PE-Cy7	
CD4	RM4.5	Alexa Fluor F700	
CD44	IM7	APC-Cy7/APC	
CD45 i.v.	104	APC	
CD45 Pam	30-F11	FITC/APC	
CD64	X54-5/7.1	PE	
CD68	FA/11	Pacific Blue	
CD69	H1.2F3	PE-Cy7/PerCP	
CD73	TY/23	Pacific Blue	
CD8	S3-6.7	APC	
Dump	CD4	RM4-5	FITC
	CD8	S3-6.7	FITC
	CD19	1D3	FITC
	NK1.1	PK136	FITC
FOXP3	FJK-16s	APC	
I-A[b]	25 9 17	BV650	
Live and Dead	-	PE-Texas Red	
KLRG1	2F1	BV711	
Ly6C	AL-21	APC	
Ly6G	1A8	PE-Cy7	
P2X7	1F11	PE/BV786	
PD-1	J43	Pacific Blue	
Tbet	ebio4B10	PerCP/BV786	

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados

3.7. Análise macroscópica e microscópica do pulmão

Os lóbulos pulmonares coletados foram lavados com PBS estéril 1x e pesados em balança analítica. O lobo superior esquerdo do pulmão, o baço e o fígado foram mantidos em formalina tamponada a 10% por 48 horas. Após fixado, o lóbulo superior esquerdo do pulmão foi fotografado e posteriormente incluído em parafina juntamente com o baço e o fígado. Cortes histológicos de aproximadamente 4-5 μm foram corados usando o método de hematoxilina-eosina (HE) para visualizar alterações teciduais e com o método de Ziehl Neelsen (ZN) para detectar a presença de bactérias ácido-álcool resistentes. As amostras foram examinadas com microscópio Axioplan (Carl Zeiss Inc., Alemanha) e as imagens foram capturadas por câmera Coolpix P995 acoplada ao dispositivo (Nikon).

3.8. Análise e contagem das UFC

As concentrações bacterianas no homogenato do pulmão dos camundongos infectados foram determinadas pelo teste de UFC. As amostras passaram por cinco diluições seriadas de 10 vezes e cada suspensão foi plaqueada em agar Middlebrook 7H10 (Difco, Detroit, MI), suplementado com 0,5% de glicerol, 10% de ácido oleico – enriquecido com albumina-dextrose-catalase, OADC (BD, Sparks, MD). As placas foram cultivadas em estufa a 37°C durante 21 dias e o número total de UFC foi determinado por contagem das colônias.

3.9. Isolamento e cultura de MDMO

Os MDMOs murinos foram gerados através do isolamento de monócitos indiferenciados da medula óssea de ambos os fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 e *Entpd1^{-/-}*. A medula óssea foi coletada através de lavagem com seringa e agulha de calibre 16 em DMEM/F-12 (Gibco) suplementado com 10% de SFB inativado por calor (Gibco). As células foram dispersas com uma seringa de 5 mL (BD Biosciences) que foi equipada com uma agulha de calibre 20. As células dispersas foram semeadas em frascos de cultura (T-175) contendo 20 mL de DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Gibco) e 20% de meio condicionado de L929. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂. No terceiro dia de cultura, foram adicionados 20 mL de meio fresco contendo meio condicionado com L929 sem gentamicina. No dia 7

de cultura, os macrófagos foram coletados da garrafa de cultura pela adição de PBS gelado e incubação em geladeira a 4°C.

3.10. Infecção *in vitro* dos MDMO

Os MDMO foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 1×10^5 células por poço. Alíquotas de micobactérias Mtb Beijing M299 foram descongeladas e cultivadas como descrito NO ITEM 3.2. As suspensões micobacterianas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min e ressuspensas em meio PBS 1X. Em seguida, a suspensão micobacteriana foi sonicada por 30s e homogeneizada para dispersar os grumos. Após dispersão dos grumos, as micobactérias foram marcadas com CFSE por 20 minutos em estufa à 37°C e em seguida lavadas 3x com PBS 1x com 10% de SFB. Os MDMOs foram expostos à infecção por Mtb Beijing M299 fluorescente com 1:10 MOI durante 3 horas de incubação. Após 3 horas de incubação com as micobactérias, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x em temperatura ambiente e depois mantidas em cultura em meio DMEM-F12 fresco, suplementado com 3% de SFB durante 24 horas. Após 24h de cultura, os sobrenadantes foram coletados para quantificação das UFC extracelulares e as células foram marcadas com Live and Dead por 20 minutos à 4°C para avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo.

3.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 7 (GraphPad, EUA), e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%). ANOVA e pós-teste de Bonferroni analisaram os efeitos simultâneos de dois fatores. Para avaliar os efeitos de um único parâmetro foram utilizados One-way ANOVA e teste T com pós-teste de Tukey.

4.Resultados

4.1. CD39 e P2X7 são mais expressos por células imunes comparado a células estruturais, mas apenas CD39 e CD73 são reguladas positivamente em células imunes durante a fase aguda de infecção por Mtb;

Primeiro decidimos avaliar a expressão de CD39, CD73 e P2X7 em células imunes e estruturais do pulmão de camundongos infectados e não infectados por Mtb. Para isso, os pulmões de camundongos C57BL/6 foram coletados após 28 dias de infecção com 200 bacilos de Mtb Beijing M299. A distribuição das proporções de células CD45⁺ e CD45⁻ no pulmão dos camundongos infectados e não infectados por Mtb foi avaliada por citometria de fluxo através de análise espacial por tSNE (t-distributed stochastic neighbor embedding). Uma maior frequência de células CD45⁺ foi observada no pulmão dos camundongos após 28 dias de infecção por Mtb em comparação com camundongos não infectados. Nos heatmaps adjacentes é possível observar que a maior intensidade de expressão de CD39, CD73 e P2X7 se localiza com a população de células CD45⁺ viáveis do pulmão (**Figura 8A**). Corroborando com isso, foi observado que células CD45⁺ representam a maior de frequência de células do pulmão dos animais infectados que são positivas para CD39, CD73 e P2X7 (**Figura 8B**).

A quantificação da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) revelou que células CD45⁺ infiltradas no pulmão possuem maior expressão de CD39 e P2X7 do que células CD45⁻, tanto nos animais não infectados, quanto nos animais infectados. Entretanto, nenhuma diferença foi observada na expressão de CD73 entre as populações de células CD45⁺ e CD45⁻ em animais não infectados e infectados. Uma maior expressão de CD39 e CD73 também foi observada em células CD45⁺ do pulmão de camundongos infectados, comparado com células CD45⁺ de camundongos não infectados. Porém, nenhuma alteração na expressão de CD39 e CD73 em células CD45⁻ de camundongos não infectados e infectados foi observada. Também não foram observadas alterações na expressão de P2X7 em células CD45⁺ ou CD45⁻ comparando camundongos não infectados e infectados (**Figura 8C**). Esses dados sugerem que as moléculas purinérgicas CD39 e CD73 são upreguladas em células imunes do pulmão durante a infecção por Mtb em resposta ao aumento da inflamação local. Além disso, uma maior expressão de CD39

combinada com a expressão de P2X7 em células imunes pode indicar um papel importante da CD39 para a regulação negativa das funções celulares mediadas pela sinalização de ATP extracelular no pulmão.

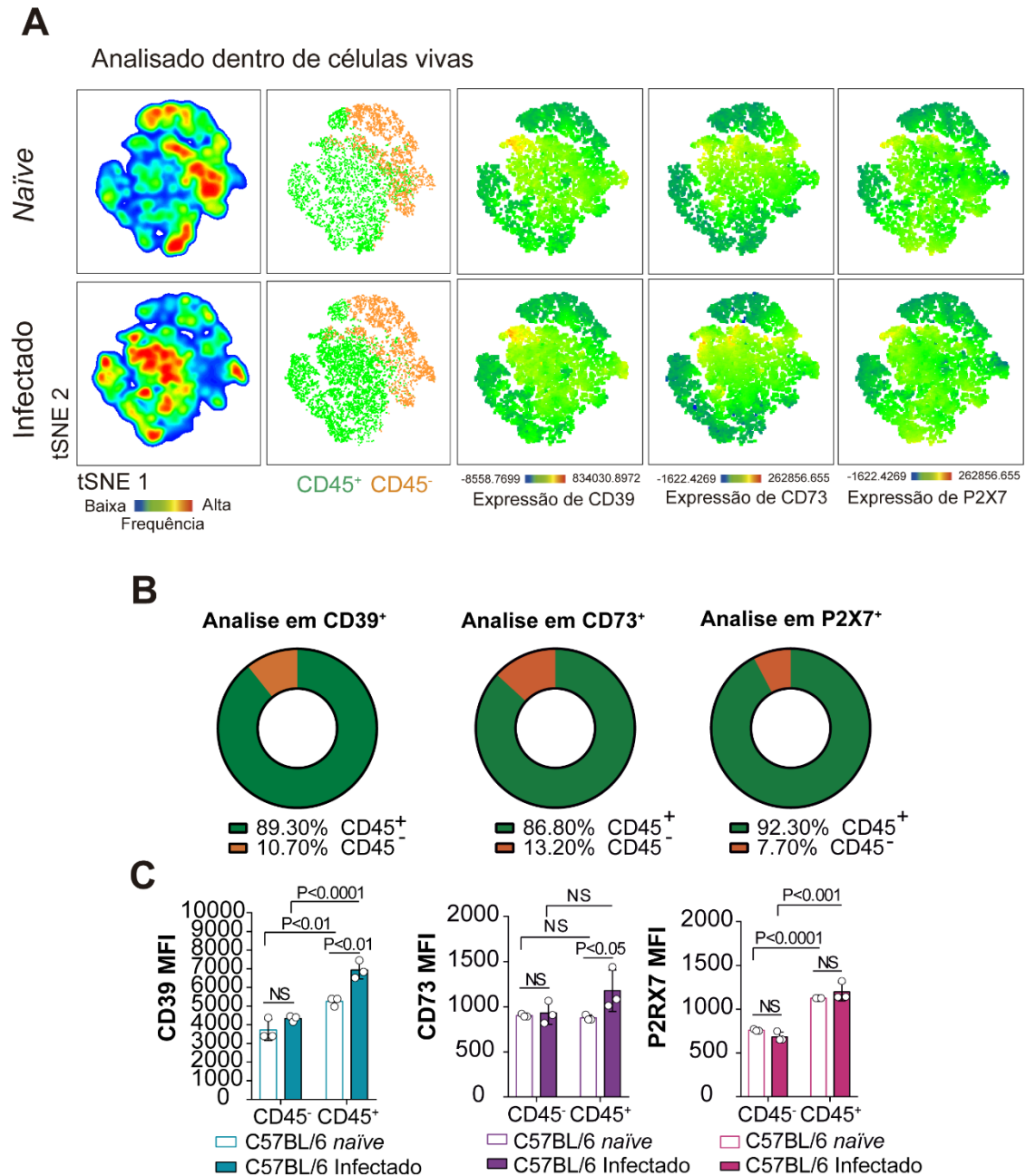


Figura 8. Avaliação da expressão das moléculas purinérgicas CD39, CD73 e P2X7 no pulmão de camundongos infectados. Distribuição das subpopulações de células CD45⁺ e CD45⁻ no pulmão dos camundongos avaliadas através de análise de distribuição espacial em tSNE, com sobreposição da análise convencional de citometria de fluxo e mapas de calor (A). Camundongos C57BL/6 foram infectados com 200 bacilos de Mtb Beijing M299. Gráficos de distribuição mostrando as porcentagens de células CD45⁺ e CD45⁻ que expressam CD39, CD73 e P2X7 (B). Gráficos de barra mostrando a média geométrica da intensidade de fluorescência de CD39, CD73 e P2X7 em células CD45⁺ e CD45⁻ do pulmão de camundongos infectados e não infectados (C). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com quatro a cinco camundongos em cada grupo.

4.2. A expressão de CD39 é regulada positivamente no 28º dia após infecção por Mtb altamente virulenta, sendo macrófagos as células que mais expressam CD39 no pulmão neste período de infecção

Nos resultados anteriores, observamos que a CD39 além de ser mais expressa em células imunes do que em células estruturais, também possui sua expressão regulada positivamente durante a infecção por Mtb. Desta forma, decidimos avaliar a cinética de expressão de CD39 nas principais subpopulações de células CD45⁺ infiltrantes do pulmão durante o curso de desenvolvimento da tuberculose pulmonar. Para isso, os pulmões de camundongos C57BL/6 foram coletados após 0, 14, 21 e 28 dias de infecção com 200 bacilos de Mtb Beijing M299. Células mielóides (CD4⁻, CD8⁻, CD19⁻) expressam constitutivamente CD39, entretanto uma maior expressão desta molécula foi observada a partir do dia 21 de infecção, com uma expressão ainda maior 28 dias após a infecção. Já nas células T CD4⁺ e CD8⁺ foi observado o aumento da expressão de CD39 em células após 28 dias de infecção (**Figura 9A**). Esses dados reforçam a hipótese de que a regulação positiva de CD39 em células imunes pode estar relacionada com o aumento da resposta inflamatória no pulmão durante a infecção por Mtb.

Comparando o GMIF de CD39 entre as três subpopulações foi observado que as células mielóides possuem maior expressão de CD39 no pulmão (**Figura 9A**). Após observar isso, decidimos avaliar a expressão de CD39 nas subpopulações de células mielóides no pulmão dos camundongos após 28 dias de infecção. A estratégia de análise das subpopulações de células mielóides está representada no apêndice 2. No mapa de calor da distribuição espacial é possível observar que a maior expressão de CD39 se localiza com as populações de macrófagos (MF). Além disso, é possível observar que as células que mais expressam CD39 nessa fase de infecção também expressam altos níveis de P2X7 (**Figura 9B**). Esses dados sugerem um papel importante da atividade de ATPase da CD39 para a regulação de macrófagos no pulmão durante a fase aguda de infecção por Mtb.

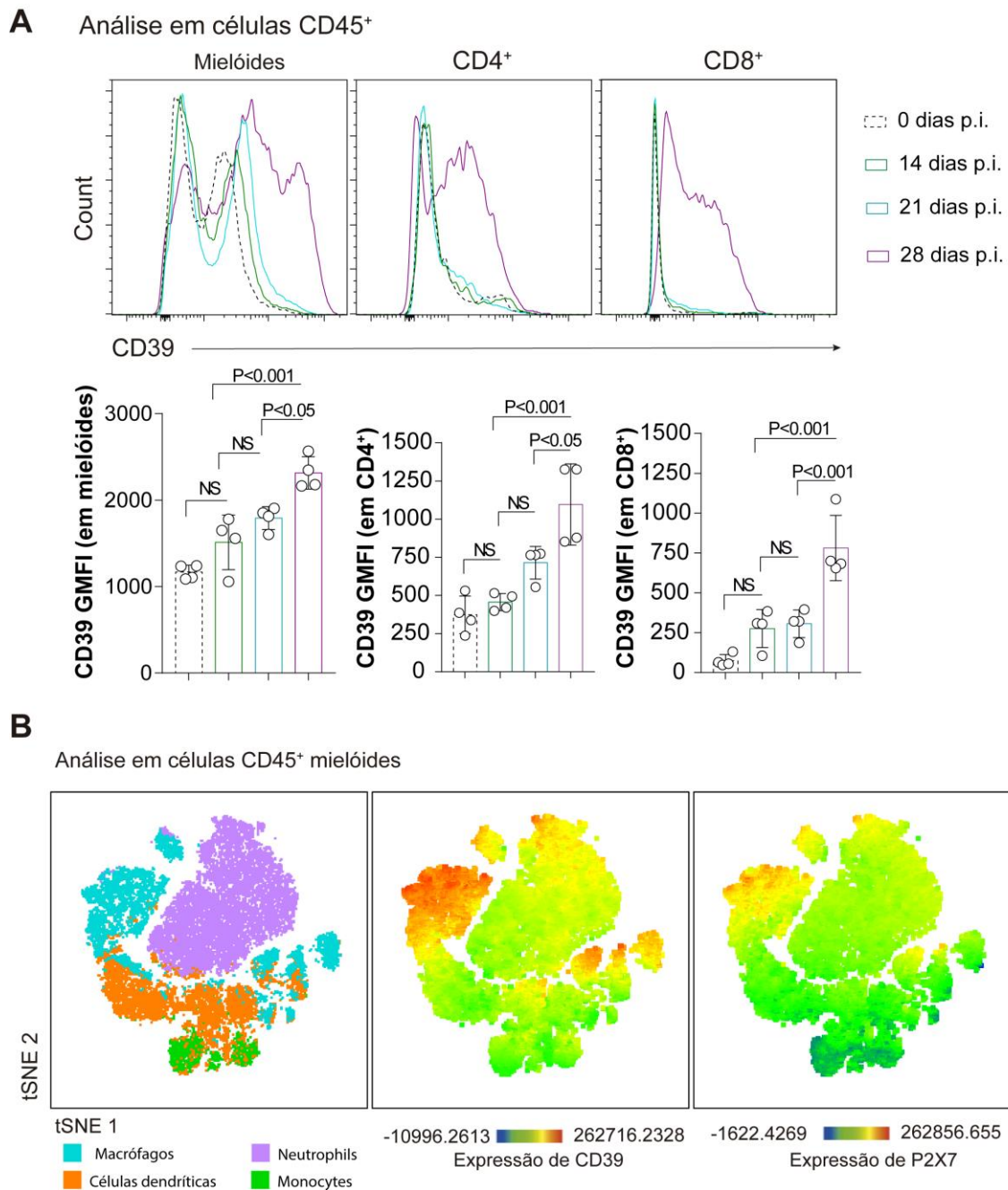


Figura 9. Análise da expressão de CD39 em células imunes do pulmão durante o curso de infecção por *Mtb* altamente virulenta. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 200 bacilos de *Mtb* Beijing M299. Histogramas e gráficos de barras mostram a expressão de CD39, calculada através da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) em células Mielóides (CD4⁻, CD8⁻, CD19⁻, NK1.1⁻), células T CD4⁺ e CD8⁺ isoladas do pulmão de camundongos C57BL/6 após 0, 14, 21 e 28 dias de infecção com 200 bacilos de *Mtb* Beijing M299 (A). Distribuição das subpopulações de células mielóides no pulmão avaliadas através de análise de distribuição espacial em tSNE, com sobreposição da análise convencional de citometria de fluxo e mapa de calor da expressão de CD39 e P2X7 (B). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com quatro a cinco camundongos em cada grupo.

4.3. Macrófagos derivados de medula são mais suscetíveis à morte celular e liberam mais Mtb na ausência de expressão de CD39

Macrófagos são células chave no controle da infecção por Mtb. Desta forma, decidimos avaliar como a expressão de CD39 afeta a resposta de macrófagos à infecção por Mtb. Para isso, MDMOs de camundongos C57BL/6 e *Etpd1*^{-/-} foram infectados com MOI:10 de Mtb Beijing M299/CFSE-FITC⁺ e mantidos em cultura por 24h. Na avaliação de viabilidade por citometria de fluxo, foi observada uma maior frequência de MDMOs C57BL/6 infectados por Mtb fluorescente que permaneceram viáveis, em comparação com MDMOs de camundongos *Etpd1*^{-/-}. Em contraste, foi observada uma maior frequência de macrófagos mortos nas culturas de MDMOs *Etpd1*^{-/-} (Figuras 10A, 10B e 10C). Somado a isso, foi observado uma maior contagem de UFC no sobrenadante da cultura de MDMOs *Etpd1*^{-/-} em comparação com MDMOs C57BL/6 (Figura 10D). Esses dados sugerem que os macrófagos deficientes para CD39 são mais suscetíveis à morte celular e liberação de micobactéria para o meio extracelular.

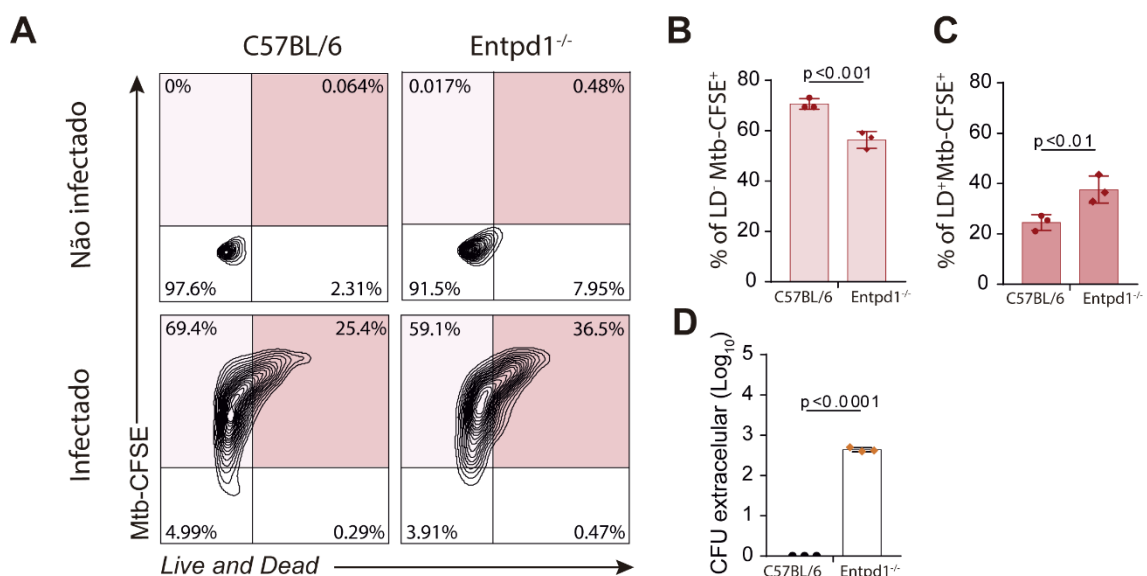


Figura 10. Avaliação da viabilidade de MDMOs após infecção com Mtb altamente virulenta. MDMOs isolados de camundongos C57BL/6 e *Etpd1*^{-/-} foram infectados com MOI:10 de Mtb Beijing M299 marcada com CFSE. Contour-plots mostram populações de macrófagos derivados de medula óssea (MDMOs) infectados ou não com micobactéria fluorescente e marcados com Live and Dead (A). Frequência de células infectadas e negativas para marcador de viabilidade Live and Dead (B). Frequência de células infectadas e positivas para marcador de viabilidade Live and Dead (C). Contagem das unidades formadoras de colônia nos sobrenadantes das culturas de MDMOs (D). Os dados são representativos de dois experimentos independentes com quatro a cinco camundongos em cada grupo.

4.4. Deficiência de CD39 induz tuberculose letal em camundongos infectados

Para avaliar como a deficiência de CD39 afeta o desenvolvimento da tuberculose pulmonar *in vivo*, camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} foram infectados com 200 bacilos da cepa altamente virulenta Mtb Beijing M299. O peso corporal dos camundongos foi avaliado a cada 2 dias e os camundongos foram eutanasiados quando foram observados sinais de caquexia com perda de peso acentuada (>20% do peso corporal inicial). Camundongos *Entpd1*^{-/-} começaram a perder peso a partir de 14 dias após infecção e atingiram ponto humanitário para eutanásia entre 18 e 27 dias p.i.. Em contraste 87,5% dos camundongos C57BL/6 sobreviveram até 42 dias p.i. quando foram eutanasiados no fim do experimento (**Figuras 11A e 11B**). Os pesos dos pulmões de camundongos *Entpd1*^{-/-} foram notavelmente maiores, a medida que atingiram o estado de caquexia e foram eutanasiados (**Figura 11C**). Comparando o tamanho do pulmão de camundongos de ambos os grupos que atingiram ponto humanitário para eutanásia no dia 24 p.i. é possível observar que o pulmão do camundongo *Entpd1*^{-/-} é maior e possui um maior número de nódulos brancos do que o pulmão do camundongo C57BL/6 eutanasiado no mesmo dia (**Figura 11D**). A análise histopatológica também mostra extensas lesões necróticas (asterísticos), áreas de alveolite (setas amarelas) e edema (setas pretas) no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-}. Em contraste, em camundongos C57BL/6 foram observados apenas pontos iniciais de necrose circundados por áreas de alveolite (setas azuis) (**Figura 11E**). Os resultados mostram que a deficiência de CD39 resulta no aumento de lesões necróticas no pulmão de camundongos infectados e redução da sobrevivência dos animais infectados. Isso sugere que a sobrevivência de camundongos infectados por Mtb altamente virulenta requer expressão de CD39 no pulmão durante a fase aguda de infecção.

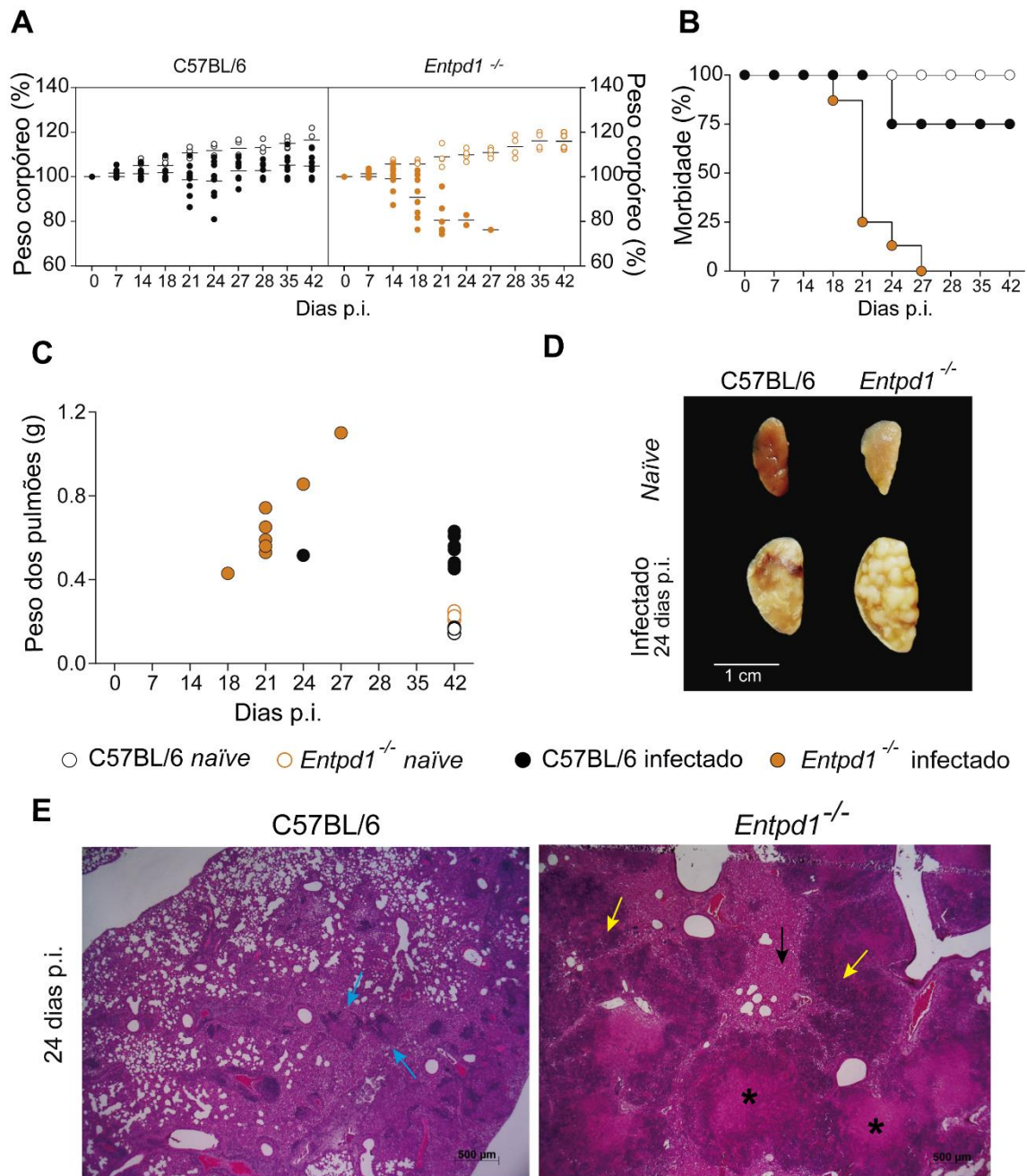


Figura 11. Avaliação dos efeitos da deficiência de CD39 no aumento da morbidade dos camundongos infectados. Camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} foram infectados com baixa dose (100) bacilos de *Mtb* Beijing M299. Os camundongos foram sacrificados quando foram observados sinais de caquexia com perda de peso acentuada (> 20% do peso corporal inicial) e os pulmões foram colhidos. O peso corporal dos camundongos (A). Curvas de morbidade dos camundongos (B). Peso do pulmão (C) curva de camundongos sacrificados. (D) Comparação da macropatologia pulmonar (E). Imagens representativas de seções de pulmão coradas com hematoxilina-eosina (as barras de escala correspondem a 1000 µm) são mostradas. Asteriscos (*) indicam áreas de necrose e hashtags (#) indicam áreas de alveolite, seta amarela indica área de edema pulmonar. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos indicados com *** $p < 0,001$. Os dados representam a junção de dados de dois experimentos independentes.

4.5. Deficiência de CD39 culmina em maior perda de peso corpóreo, maior carga bacteriana, lesões necróticas e lesões extrapulmonares mesmo em baixas doses de infecção por Mtb

Para avaliar se o fenótipo observado se manteria na doença moderada, camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} foram infectados com 100 bacilos da cepa altamente virulenta Mtb Beijing M299. Mesmo com uma menor dose de infecção, camundongos *Entpd1*^{-/-} foram mais susceptíveis à perda de peso corporal do que camundongos C57BL/6 (**Figura 12A**). Também foi observada uma maior carga bacteriana no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} após 28 de infecção, com dois logs a mais de micobactérias do que o observado em camundongos C57BL/6 (**Figura 12B**). Não foram observadas diferenças no peso e tamanho dos pulmões entre os dois grupos com esta dose de infecção (**Figura 12C**). Entretanto, as histopatologias do pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} e C57BL/6 são completamente diferentes. Os pulmões de camundongos C57BL/6 possuem extenso infiltrado inflamatório cobrindo um terço do lóbulo superior esquerdo, com ausência de áreas visíveis de necrose. Em contraste, o infiltrado inflamatório nos pulmões de camundongos *Entpd1*^{-/-} é acompanhado por extensas áreas de necrose (**Figura 12D**). Ao avaliar a colocalização das micobactérias com o infiltrado celular é possível observar um maior número de bacilos álcool-ácido resistentes extracelulares colocalizados com as áreas de necrose e alveolite em camundongos *Entpd1*^{-/-}. Enquanto em camundongos C57BL/6 foram observadas estruturas parecidas com granulomas sólidos com bacilos predominantemente intracelulares (**Figura 12E**). Avaliando a histopatologia do baço é possível observar uma redução das áreas de polpa branca e remodelamento tecidual. Somado a isso, na histopatologia do fígado foi observado um maior número de áreas de infiltrado inflamatório, indicando uma maior susceptibilidade dos camundongos *Entpd1*^{-/-} ao desenvolvimento de inflamação extrapulmonar associada à infecção por Mtb (**Figura 12F**). Esses dados indicam que camundongos *Entpd1*^{-/-} são mais susceptíveis ao desenvolvimento de lesões necróticas no pulmão e inflamação extrapulmonar mesmo em doses mais baixas de infecção.

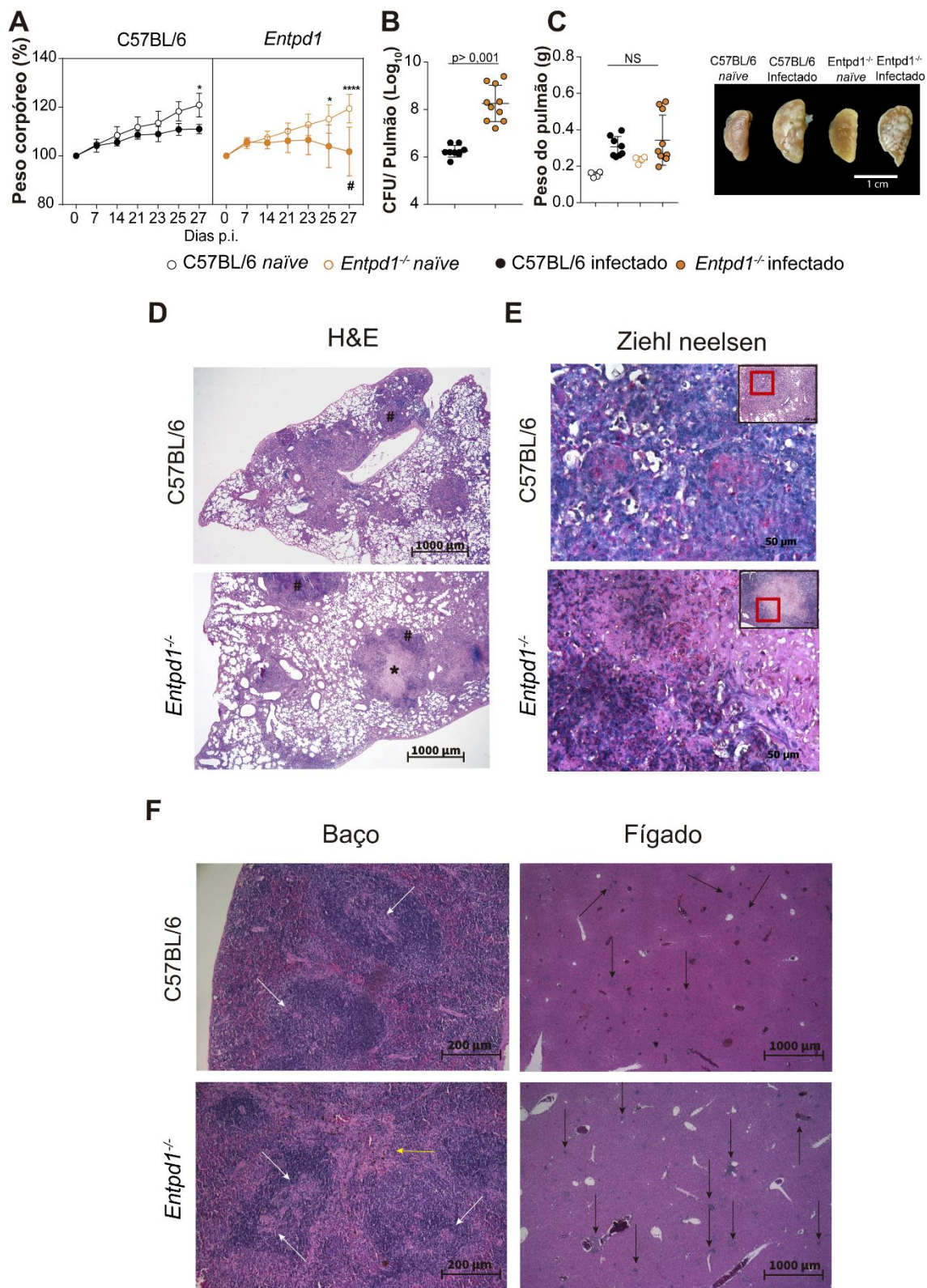


Figura 12. Avaliação dos efeitos da deficiência de CD39 em baixa dose de infecção por *Mtb* altamente virulenta. Camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} foram infectados com baixa dose (100) bacilos de *Mtb* Beijing M299. Peso corpóreo (C) e contagem das unidades formadoras de colônias no pulmão de camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} (D). Imagens representativas de seções de pulmão coradas com hematoxilina-eosina e Ziehl Neelsen (as barras de escala correspondem a 1000 μm) são mostradas. Asteriscos (*) indicam áreas de necrose e hashtags (#) indicam áreas de alveolite. (E) Imagens representativas de lâminas do baço coradas com o

método de hematoxilina-eosina (barras de escala correspondem a 200 μm) são mostrados. As setas brancas indicam granulomas nos folículos da polpa branca e as setas amarelas indicam granulomas e áreas de fibrose. Imagens representativas de lâminas de fígado coradas com método de hematoxilina-eosina (escala barras correspondem a 1000 μm) são mostradas. As setas pretas indicam inflamação granulomatosa (F). Os dados representam a junção de dados de dois experimentos independentes.

4.6. Deficiência de CD39 induz redução dos números de macrófagos e células dendríticas, aumento dos números de neutrófilos e monócitos e aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias no pulmão de camundongos infectados;

Para avaliar como a CD39 influencia a resposta de células mielóides no pulmão durante a infecção por Mtb, camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} foram infectados com 100 bacilos de Mtb Beijing M299. Após 28 dias de infecção os pulmões foram coletados para análise do infiltrado celular inflamatório por citometria de fluxo. Para avaliar as alterações das proporções de células mielóides encontradas nos pulmões dos camundongos infectados de ambos os grupos, foi realizada uma análise de distribuição espacial por tSNE. Uma menor frequência das populações de macrófagos e células dendríticas foi observada no pulmão dos camundongos *Entpd1*^{-/-}. Em contraste uma maior frequência de neutrófilos e monócitos foi observada no pulmão destes camundongos, quando comparado à camundongos C57BL/6 (**Figura 13A**). Corroborando com esses dados, também foi observado um menor número de macrófagos e células dendríticas e um maior número de neutrófilos e monócitos no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-}, quando comparados aos camundongos C57BL/6 infectados (**Figura 13B**). Esses resultados ressaltam o papel protetor da expressão de CD39 em macrófagos, prevenindo a morte dessas células durante a infecção por Mtb no pulmão.

Avaliando os níveis de citocinas no homogenato pulmonar, foi observado um aumento da produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-}. Dentre as citocinas avaliadas, foi observado o aumento dos níveis de citocinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-1 β liberadas durante o processo de morte celular necrótica. Também foram observados níveis mais altos das quimiocinas CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4 e do fator de crescimento M-CSF no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-}. Em contraste, níveis mais baixos de CCL5 e VEGF foram observados no homogenato pulmonar de camundongos *Entpd1*^{-/-} (**Figura 13C**). Esse conjunto de resultados indica um importante papel

da expressão de CD39 para regulação negativa da inflamação mediada por citocinas, que contribui para agravamento das lesões inflamatórias no pulmão.

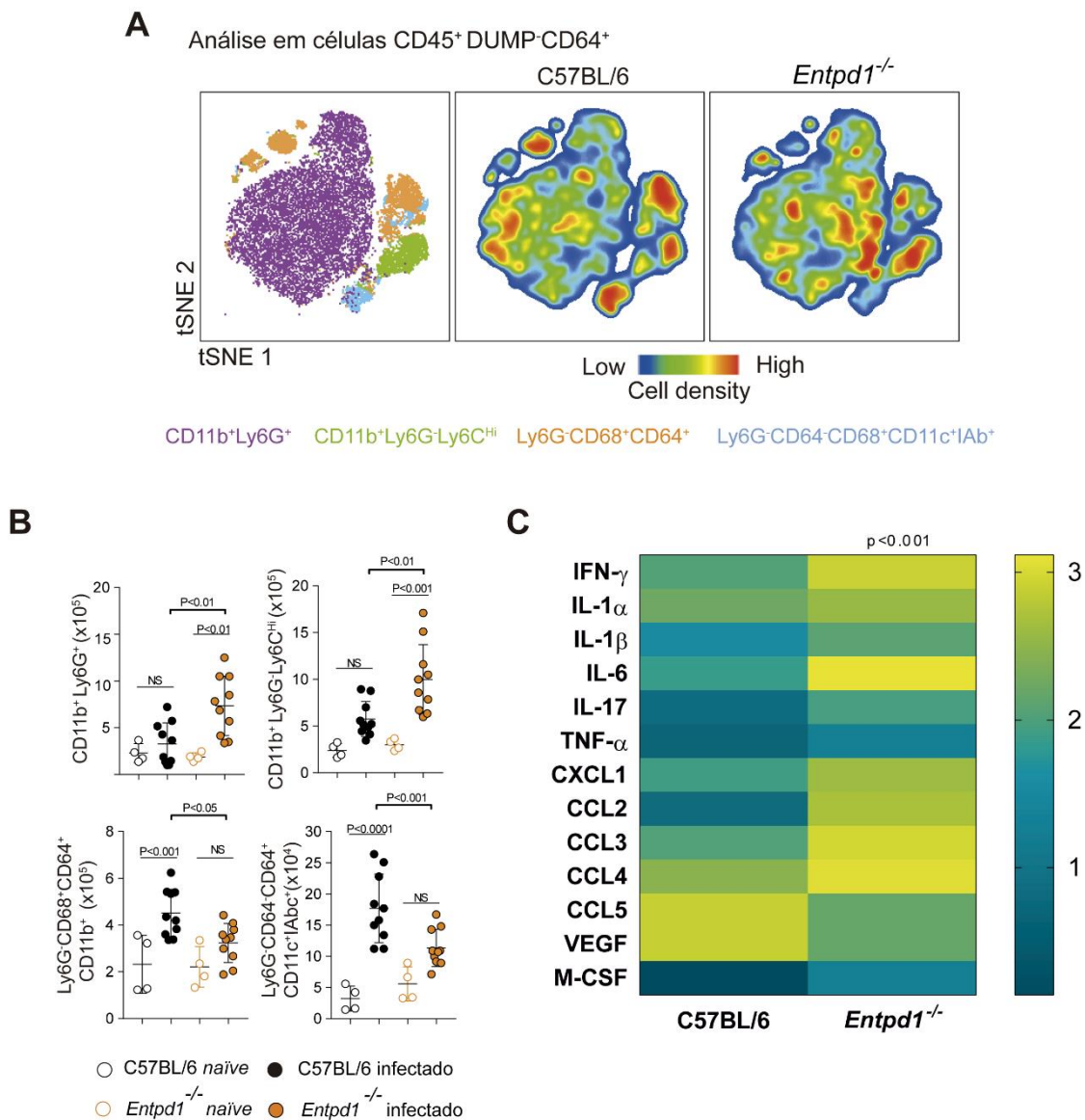


Figura 13. Avaliação do efeito da deficiência de CD39 na resposta de células mielóides e produção de citocinas no pulmão de camundongos infectados. Camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} foram infectados com baixa dose (100) bacilos de Mtb Beijing M299. Distribuição da frequência das subpopulações de células mielóides (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁻, NK1.1⁻) no pulmão avaliadas através de análise de distribuição espacial em tSNE, com sobreposição da análise convencional de citometria de fluxo (A) Número total de células Ly6G⁺Ly6C^{Low}CD11c⁻, Ly6G⁻Ly6C^{high}CD11c⁺, Ly6G⁻Ly6G⁻CD11c⁻CD64⁺ e Ly6G⁻Ly6G⁻CD11c⁺ por pulmão (B). Níveis de citocinas detectadas no homogenato pulmonar de camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} infectados em que foram observadas diferenças estatísticas (p<0,001) entre os grupos (D). Os dados representam a junção de dados de dois experimentos independentes.

4.7. Deficiência de CD39 resulta em menor número de células T CD4⁺ naíves no pulmão e induz aumento da expressão de CD69 em células ativadas

Ao avaliar os números totais de linfócitos T no pulmão de camundongos infectados, foi observado um menor número de linfócitos T CD4⁺ no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} em relação aos camundongos C57BL/6 infectados. Entretanto, nenhuma diferença no número de células T CD8⁺ foi observado (**Figura 14A**). Desta forma decidimos avaliar quais alterações nas proporções das subpopulações de células T CD4⁺ podem ter resultado em um menor número destas células no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados. Para isso camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} foram infectados com 100 bacilos de Mtb Beijing M299. Previamente a infecção, os camundongos receberam tratamento com anticorpo CD45 por via intravenosa para excluir as células T CD4⁺ que não estão localizadas no parênquima pulmonar (**Figura 14B**). Um menor número de células T CD4⁺ naíves (CD45⁻CD44⁻) foi observado no parênquima pulmonar de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados, comparados a camundongos C57BL/6 infectados (**Figura 14C**). Avaliando as células T CD4⁺ parenquimais ativadas, não foram observadas diferenças nos números comparando camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados. Entretanto foi observado um aumento na expressão de CD69 em células T CD4⁺ parenquimais ativadas em camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados (**Figura 14D**). Avaliando o perfil das células parenquimais através da expressão de FOXP3 e Tbet, não foram observadas diferenças nos números de células Tregs ou de células Th1 no pulmão dos camundongos infectados (**Figura 14E**). Entretanto, foi observado que as células FOXP3⁺ e Tbet⁺ do parênquima pulmonar de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados, possuem menor capacidade proliferativa, em comparação à células de camundongos C57BL/6 infectados. Esses dados sugerem que a CD39 possivelmente desempenha um importante papel regulador da função de células Tregs e células Th1 durante a infecção por Mtb.

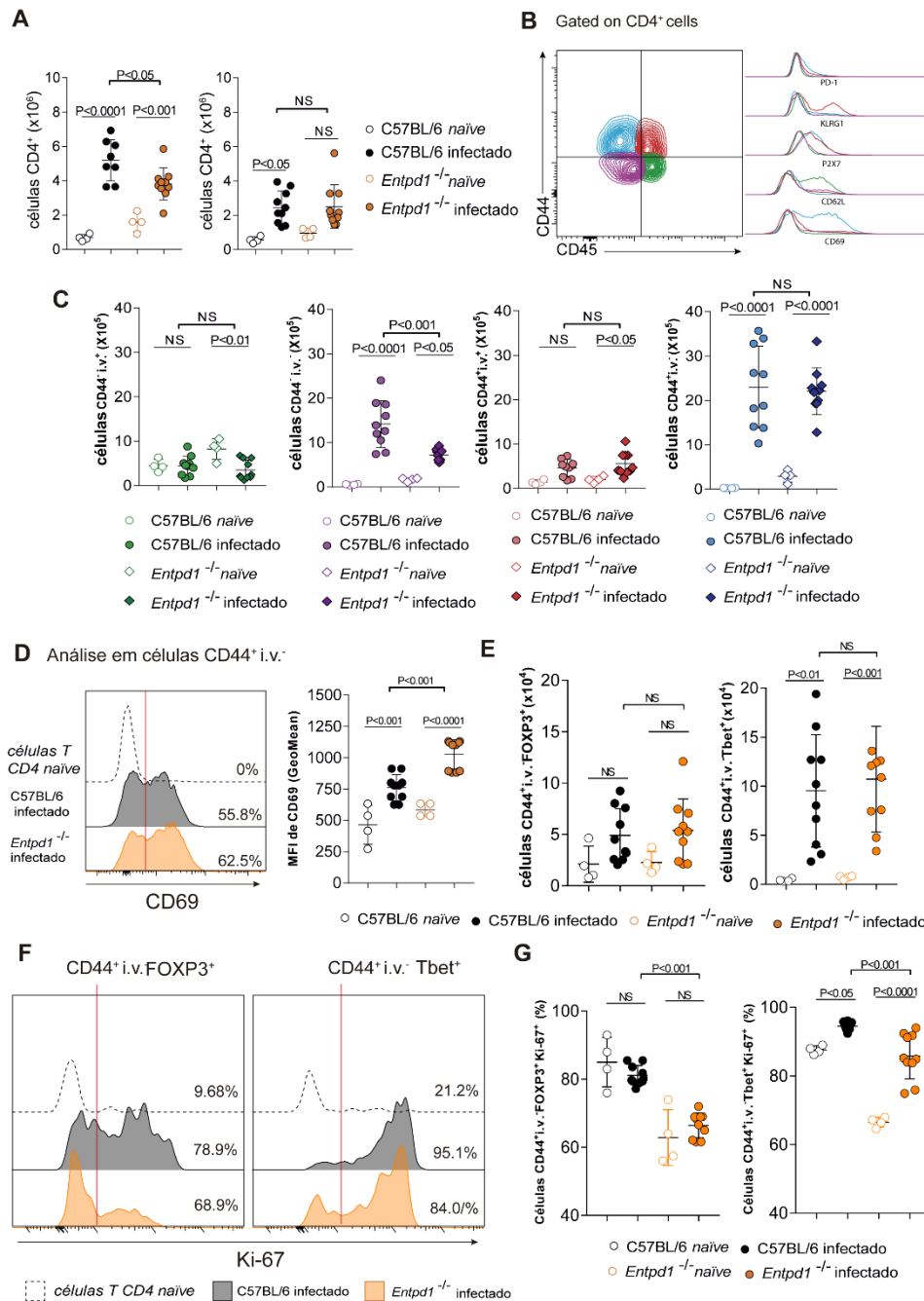


Figura 14. Avaliação do efeito da deficiência de CD39 na resposta de células T no pulmão de camundongos infectados. Camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} foram infectados com baixa dose (100) bacilos de *Mtb* Beijing M299. Número total de células CD4⁺ e CD4⁺ por pulmão de camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} coletados após 28 dias de infecção com 100 bacilos de *Mtb* Beijing M299 (A). Distinção das subpopulações de células T CD4⁺ vasculares e parenquimais no pulmão de camundongos infectados (B). Número total das subpopulações de células T CD4⁺ (C). Gráfico de histograma mostra a diferença nas frequências de células CD69⁺ no parênquima pulmonar de camundongos infectados e gráfico de barra mostra a média geométrica da intensidade de fluorescência de CD69 em células T CD4⁺ parenquimais ativadas (D). Números totais de células CD4⁺CD44⁺i.v.:FOXP3⁺ e CD4⁺CD44⁺i.v.:Tbet⁺ (E). Frequência de células CD4⁺CD44⁺i.v.:FOXP3⁺ e CD4⁺CD44⁺i.v.:Tbet⁺ positivas para Ki-67 (F e G). Os dados representam a junção de dados de dois experimentos independentes.

5. Discussão

A tuberculose severa leva a uma condição altamente inflamatória que induz um espectro diversificado de lesões pulmonares, como a pneumonia necrótica, que contribui para a progressão e transmissão da doença (DHEDA; BOOTH; HUGGETT; JOHNSON *et al.*, 2005; DORHOI; KAUFMANN, 2016). A avaliação dos mecanismos associados ao desenvolvimento de lesões necróticas durante a TB depende de modelos animais que reproduzam diferentes tipos de patologia necrótica. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa e de colaboradores mostram que a infecção com cepas hipervirulentas de micobactérias, incluindo cepas de Mbv e Mtb desencadeia lesões pulmonares com uma evolução semelhante ao observado na tuberculose pós-primária em humanos (ALMEIDA; VENTURA; AMARAL; RIBEIRO *et al.*, 2017; AMARAL; RIBEIRO; LANES; ALMEIDA *et al.*, 2014). O modelo murino de tuberculose grave, possibilitou nosso grupo relatar alguns dos mecanismos que amplificam a resposta imune disfuncional e exacerbada que agrava as lesões pulmonares e contribui para o agravamento da doença. No entanto, os mecanismos subjacentes à regulação da inflamação exacerbada e lesão tecidual mediados pela sinalização purinérgica durante a TB não foram completamente compreendidos. Ajudando a compreender melhor os mecanismos envolvidos na regulação desses processos, nossos dados fornecem evidências do papel protetor exercido pela ectonucleotidase CD39 durante a infecção por Mtb altamente virulenta em camundongos.

A CD39 é constitutivamente expressa por uma grande variedade de células imunes e células estruturais (HEINE; BRAUN; SÉVIGNY; ROBSON *et al.*, 2001). Nós observamos que durante a fase aguda de infecção por Mtb, as células imunes (CD45⁺) possuem uma maior frequência de células positivas para as moléculas purinérgicas CD39, CD73 e P2X7 no pulmão em comparação à células estruturais (CD45⁻). Há também uma diferença na intensidade de expressão das moléculas purinérgicas entre as populações de células CD45⁺ e CD45⁻. Enquanto células CD45⁺ expressam mais CD39 e P2X7 do que células estruturais, não há diferença na expressão de CD73 entre essas duas populações. Uma maior proporção de células imunes em relação à células estruturais no pulmão de camundongos dos infectados, somado às diferenças observadas na intensidade de expressão na fase aguda de infecção indicam que

as células imunes ditam o reconhecimento e sinalização por nucleosídeos no pulmão de camundongos infectados.

A expressão e função da CD39 em células imunes é induzida em resposta a condições de hipóxia (ELTZSCHIG; IBLA; FURUTA; LEONARD *et al.*, 2003) e por mediadores inflamatórios, como TNF- α e IFNs, entre outros (CHALMIN; MIGNOT; BRUCHARD; CHEVRIAUX *et al.*, 2012). Nós observamos que durante a fase aguda da doença, a expressão de CD39 foi regulada positivamente em células mielóides e células T infiltrados no pulmão. A fase aguda de infecção (28 dias p.i.) pela cepa altamente virulenta Mtb Beijing M299 é marcada inflamação pulmonar exacerbada impulsionada pela imigração aumentada de leucócitos mielóides e produção de citocinas inflamatórias (ALMEIDA; VENTURA; AMARAL; RIBEIRO *et al.*, 2017). A regulação positiva da expressão de CD39 28 dias p.i. pode ter sido induzida pelo microambiente altamente inflamatório no pulmão gerado em resposta ao Mtb durante essa fase de infecção. Nós também observamos que dentre as células imunes no pulmão, os macrófagos são as células que mais expressam CD39, associada a uma alta coexpressão com P2X7. É amplamente conhecido que a CD39 limita negativamente a ativação e morte de macrófagos mediadas por P2X7 (LÉVESQUE; KUKULSKI; ENJYOJI; ROBSON *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstraram que os macrófagos *Entpd1*^{-/-} são mais suscetíveis à morte celular quando expostos a concentrações milimolares de ATP (2mM) e que a produção de IL-1 β e IL-18 aumenta nessas células após o *priming* por TLR2 ou TLR4 (LÉVESQUE; KUKULSKI; ENJYOJI; ROBSON *et al.*, 2010). Em experimentos com MDMO infectados com Mtb M299 altamente virulenta observamos que os MDMO derivados de camundongos *Etpd1*^{-/-} são mais susceptíveis à morte celular induzida pela infecção por Mtb e liberação de bacilos extracelulares. O eATP liberado pelas células danificadas infectadas pode ativar P2X7R na superfícies de células vizinhas, potencializando a morte necrótica de macrófagos infectados e a disseminação de bacilos (AMARAL; RIBEIRO; LANES; ALMEIDA *et al.*, 2014). Esses dados sugerem que a CD39 pode desempenhar um papel protetor tanto autócrino quanto parácrino para macrófagos do pulmão que também expressam altos níveis P2X7.

Ao infectar camundongos *Etpd1*^{-/-} com a Mtb altamente virulenta, foi observado que a deficiência de CD39 induziu tuberculose letal em 100% dos camundongos

infectados antes de 28 dias de infecção. Em contraste a maior porcentagem dos camundongos C57BL/6 sobreviveram até o dia 42 após a infecção, quando foi finalizado o experimento. As extensas lesões necróticas, combinadas com pneumonia intensa e edema pulmonar observadas nos pulmões dos camundongos, indicam que a morbidade dos camundongos *Etpd1*^{-/-} pode estar relacionada com a perda da função pulmonar nestes camundongos. Isso sugere que a CD39 desempenha um papel central no controle da progressão da doença, aumentando a sobrevivência dos camundongos.

Mesmo em doses mais baixas de infecção, camundongos *Etpd1*^{-/-} infectados se demonstraram mais susceptíveis à perda de peso. Altos níveis de TNF- α estão diretamente relacionadas à indução de caquexia em camundongos (CERAMI; BEUTLER, 1988). A maior perda de peso pode estar associada aos maiores níveis de TNF- α observados no homogenato pulmonar de camundongos *Entpd1*^{-/-}. O desenvolvimento da necrose no pulmão coincidiu com o aumento da migração de neutrófilos, monócitos e maior carga bacteriana no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-}. Somado a isso também foram observados menores números de macrófagos e células dendríticas no pulmão dos camundongos *Entpd1*^{-/-}. Respostas eficientes à infecção intracelular por Mtb dependem diretamente da viabilidade celular dos fagócitos. O menor número de macrófagos e células dendríticas no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-}, pode ser resultado de uma maior susceptibilidade à morte celular.

O acúmulo de eATP em decorrência da morte por necrose desencadeia um ciclo vicioso que exacerba o recrutamento células imunes permissivas ao Mtb, o que contribui para o aumento da carga bacteriana nos pulmões e para o agravamento das lesões necróticas (BARBOSA BOMFIM; PINHEIRO AMARAL; SANTIAGO-CARVALHO; ALMEIDA SANTOS *et al.*, 2021). Em camundongos *Entpd1*^{-/-} também foi observado um aumento de lesões extrapulmonares induzidas pela infecção por Mtb. A morte de macrófagos é um dos fatores associados à maior disseminação das lesões necróticas no pulmão durante a TB, bem como sua disseminação para outros órgãos (DIVANGAHI; BEHAR; REMOLD, 2013; DORHOI; KAUFMANN, 2016). Isso, indica que o aumento das lesões extrapulmonares observadas no fígado e remodelamento do baço também

podem estar relacionadas com uma maior susceptibilidade de células *Entpd1*^{-/-} à morte.

Em camundongos, o aumento massivo da migração neutrófilos é outro fator apontado como causa da exacerbação da inflamação pulmonar e progressão de das lesões necróticas no pulmão (ALMEIDA; VENTURA; AMARAL; RIBEIRO et al., 2017). Além disso, também foi demonstrado que a migração de neutrófilos imaturos é dependente da ativação de P2X7 nestas células (BOMFIM, C. C. B.; AMARAL, E. P.; CASSADO, A. D. A.; SALLES, É. et al., 2017). A expressão de CD39 por neutrófilos regula negativamente a quimiotaxia e adesão ao endotélio vascular (CORRIDEN; CHEN; INOUE; BELDI *et al.*, 2008; ELTZSCHIG; WEISSMÜLLER; MAGER; ECKLE, 2006; REUTERSHAN; VOLLMER; STARK; WAGNER *et al.*, 2009). Um maior número de neutrófilos no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} pode estar associado com um maior aumento da sinalização por eATP, que modula a ativação e migração destas células.

Níveis aumentados de IL-1 β , IL-1 α , IL-6, TNF- α , combinado com aumento dos níveis de quimiocinas como CXCL1, CCL2, CCL3 e CCL4, indicam um aumento da atividade inflamatória de células mieloides no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-}. Nas células apresentadoras de antígenos, a expressão de CD39 pode regular negativamente a ativação dessas células por meio da clivagem de eATP, controlando assim a ativação do inflamassoma NLRP3, importante para a ativação e função dessas células (LÉVESQUE; KUKULSKI; ENJYOJI; ROBSON *et al.*, 2010). O acúmulo de eATP devido à morte celular e necrose tecidual, podem levar a uma estimulação massiva da ativação de P2X7, gerando aumento no influxo ca²⁺ nos fagócitos e, conseqüentemente, regulando positivamente a ativação destas células e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (DI VIRGILIO; DAL BEN; SARTI; GIULIANI et al., 2017; SHIEH; HEINRICH; SERCHOV; VAN CALKER et al., 2014). Uma possível maior ativação de P2X7 e aumento no influxo de ca²⁺ pode ter potencializado a ativação do inflamassoma NLRP3, culminando no aumento dos níveis das formas maduras de IL-1 β observados em camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados, o que pode ter potencializado a resposta inflamatória mediada por citocinas à infecção por *Mtb* (AMARAL; RIBEIRO; LANES; ALMEIDA *et al.*, 2014). A sinalização por P2X7 em células mielóides também pode induzir maior produção das quimiocinas CCL2, CCL3,

bem como de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, que promovem o recrutamento de leucócitos para sítios inflamados (DI VIRGILIO; DAL BEN; SARTI; GIULIANI *et al.*, 2017; SHIEH; HEINRICH; SERCHOV; VAN CALKER *et al.*, 2014). Apensar de possuir um papel protetor na potencialização da atividade microbida de macrófagos, a produção excessiva de TNF- α pode resultar no desenvolvimento de imunopatologias que danificam os tecidos (DORHOI; KAUFMANN, 2014). O aumento da inflamação mediada por citocinas e da migração de células mielóides para o pulmão também podem ser resultado da ausência dos efeitos inibitórios da ADO. Uma menor sinalização por ADO no contexto da infecção pela cepa altamente virulenta de Mtb pode contribuir para prolongação da resposta imune exacerbada que resulta em dano tecidual.

A sinalização por adenosina em receptores do tipo P1 nas células T efetoras é parcialmente responsável pelas atividades imunossupressoras e anti-inflamatórias das células Treg, que expressam constitutivamente CD39 e CD73 na superfície (BORSELLINO; KLEINWIETFIELD; DI MITRI; STERNJAK *et al.*, 2007). A adenosina inibe a produção de citocinas efetoras pelas células Th1, Th2 e Th17 (CSÓKA; SELMECZY; KOSCSÓ; NÉMETH *et al.*, 2012). As células Th17 também expressam ecto-nucleotidases e suprimem a resposta das células Th1 através da geração de adenosina e sinalização pelo receptor A2A (CHALMIN; MIGNOT; BRUCHARD; CHEVRIAUX *et al.*, 2012), demonstrando que outros tipos celulares além das células Treg regulam a ativação das células Th1 via geração de adenosina. Apesar de não haver diferenças nos números de células T CD4⁺ experimentadas (CD4⁺CD44⁺) no parênquima pulmonar de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados, observamos que as células experimentadas destes camundongos expressam mais CD69, em comparação com células experimentadas de camundongos C57BL/6 infectados. Não foram observadas diferenças nos números de células Tbet⁺ no pulmão dos camundongos infectados. Entretanto, maior expressão de CD69 somada à maiores níveis de INF- γ e IL-17 indicam que as células parenquimais T CD4⁺ no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} podem estar mais ativadas. A maior ativação das células T CD4⁺ parenquimais pode estar relacionada tanto com o aumento da sinalização por eATP e menor sinalização por ADO, quanto pela maior carga bacteriana no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-}. Não foram observadas

diferenças nos números de células Treg no pulmão de camundongos infectados. Entretanto, as células FOXP3⁺ e células Tbet⁺ de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados possuem uma menor capacidade proliferativa em comparação com células de camundongos C57BL/6. A menor capacidade proliferativa de células Treg e Th1 no parênquima pulmonar de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados, sugere que a CD39 desempenha um importante papel na regulação metabólica de células T CD4 durante a infecção por Mtb. Entretanto, estudos mais aprofundados precisam ser realizados para que possamos entender melhor o papel da expressão de CD39 especificamente nas células T CD4⁺ efetoras e regulatórias durante a infecção por Mtb.

Menores níveis de CCL5 foram observados no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados. CCL5 é um importante quimioatrativo que participa da sinalização para ativação e recrutamento de leucócitos (BUATOIS; FAGÈTE; MAGISTRELLI; CHATEL *et al.*, 2010; LAZENNEC; RICHMOND, 2010). A expressão de CCL5 é induzida por IFN- γ , TNF α ou IL-1 em células T, fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e células endoteliais (MARQUES; GUABIRABA; RUSSO; TEIXEIRA, 2013). Menores níveis de CCL5 pode estar relacionado com um menor número de macrófagos, ou com disseminação do dano tecidual que pode afetar a viabilidade e função de células epiteliais e endoteliais do pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados. Entretanto, como a deficiência de CD39 pode impactar diretamente nos níveis de CCL5, precisa ser melhor estudado. Menores níveis de VEGF também foram observados no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados. O VEGF é, um componente importante do reparo tecidual e é crítico para a resolução da lesão. Os macrófagos e células endoteliais são produtores primários de VEGF durante a cicatrização de feridas, bem como na inflamação crônica (MARTIN; LEIBOVICH, 2005). A produção de VEGF células endoteliais é estimulada através da ativação do receptor A2A por ADO (HASKÓ; PACHER, 2012). Os menores níveis de VEGF podem estar relacionados tanto com os menores números de macrófagos no pulmão de camundongos *Entpd1*^{-/-} infectados, quando na ausência da sinalização por ADO.

O fato da deficiência de CD39 potencializar a ativação e exacerbação da resposta imune, indica que, a expressão desta molécula durante a tuberculose

ativa, não só contribui para o controle da morte celular mediada pelos altos níveis de eATP, mas também medeia respostas reguladoras que atenuam os efeitos nocivos da inflamação exacerbada em casos graves. Nós propomos que através da regulação negativa da ativação de P2X7 por eATP e geração de ADO, a atividade de CD39 pode contribuir para o equilíbrio entre a supressão imunomediada e controle da imunopatologia da tuberculose. Entretanto estudos mais aprofundados precisam ser realizados para entender os mecanismos relacionados ao fenótipo observado neste trabalho.

6. Conclusão

A partir dos resultados mostrados concluímos que a CD39 desempenha um papel importante no controle dos mecanismos que amplificam a resposta imune disfuncional à infecção por Mtb. A atividade de CD39 minimiza a liberação de bacilos extracelulares e lesões necróticas que contribuem para disseminação da doença para outros órgãos e auxilia no controle de progressão da doença. (**Figura 7**). Nossos achados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos que regulam a geração de necrose pulmonar durante a infecção Mtb, bem como para a geração de novas abordagens terapêuticas direcionadas ao hospedeiro visando à prevenção ou redução da necrose pulmonar durante a TB.

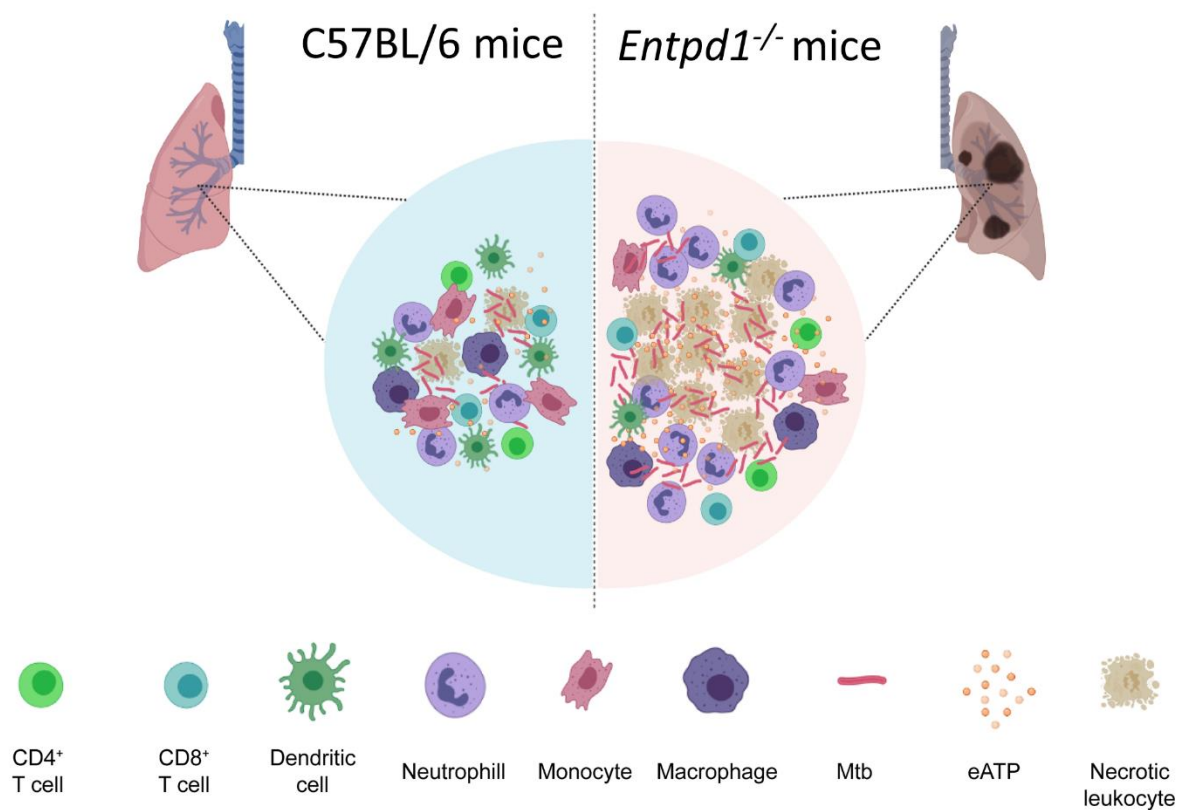


Figura 15. Visão geral das diferenças na resposta imune observada entre camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} (Feito com Biorender)

7. Referências

ABDALLAH, A. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; CHAMPION, P. A.; COX, J. *et al.* Type VII secretion--mycobacteria show the way. **Nat Rev Microbiol**, 5, n. 11, p. 883-891, Nov 2007.

ADINOLFI, E.; PIZZIRANI, C.; IDZKO, M.; PANTHER, E. *et al.* P2X(7) receptor: Death or life? **Purinergic Signal**, 1, n. 3, p. 219-227, 2005.

ALMEIDA, F. M.; VENTURA, T. L.; AMARAL, E. P.; RIBEIRO, S. C. *et al.* Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. **PLoS One**, 12, n. 3, p. e0173715, 2017.

AMARAL, E. P.; MACHADO DE SALLES, E.; BARBOSA BOMFIM, C. C.; SALGADO, R. M. *et al.* Inhibiting Adenosine Receptor Signaling Promotes Accumulation of Effector CD4+ T Cells in the Lung Parenchyma During Severe Tuberculosis. **J Infect Dis**, 219, n. 6, p. 964-974, Feb 23 2019.

AMARAL, E. P.; RIBEIRO, S. C.; LANES, V. R.; ALMEIDA, F. M. *et al.* Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. **PLoS Pathog**, 10, n. 7, 2014. Research Support, Non-U S Gov't.

ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; PACHER, P.; HASKO, G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 12, p. 842-857, 2013. Research Support, N I H , Extramural Research Support, N I H , Intramural Research Support, Non-U S Gov't Review.

ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; LA MOTTA, C.; TUCCORI, M. *et al.* Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Curr Drug Targets**, 13, n. 6, p. 842-862, Jun 2012.

ANTONIOLI, L.; PACHER, P.; VIZI, E. S.; HASKO, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends Mol Med**, 19, n. 6, p. 355-367, 2013. Research Support, N I H , Extramural Research Support, U S Gov't, Non-P H S Review.

AZOUZ, A.; RAZZAQUE, M. S.; EL-HALLAK, M.; TAGUCHI, T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. **Med Electron Microsc**, 37, n. 3, p. 141-148, Sep 2004.

BARBOSA BOMFIM, C. C.; PINHEIRO AMARAL, E.; SANTIAGO-CARVALHO, I.; ALMEIDA SANTOS, G. *et al.* Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria. **J Infect Dis**, 223, n. 3, p. 494-507, Feb 13 2021.

BHATT, K.; SALGAME, P. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. **J Clin Immunol**, 27, n. 4, p. 347-362, Jul 2007.

BIEDERBICK, A.; KOSAN, C.; KUNZ, J.; ELSÄSSER, H. P. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. **J Biol Chem**, 275, n. 25, p. 19018-19024, Jun 23 2000.

BIGONNESSE, F.; LÉVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J. *et al.* Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, 43, n. 18, p. 5511-5519, May 11 2004.

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: ATP release. **Neurochem Res**, 26, n. 8-9, p. 959-969, 2001. Research Support, Non-U S Gov't Review.

BOER, M. C.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; BASTID, J.; OTTENHOFF, T. H. *et al.* CD39 is involved in mediating suppression by Mycobacterium bovis BCG-activated human CD8(+) CD39(+) regulatory T cells. **Eur J Immunol**, 43, n. 7, p. 1925-1932, Jul 2013.

BOMFIM, C. C. B.; AMARAL, E. P.; CASSADO, A. D. A.; SALLES, E. M. *et al.* P2X7 Receptor in Bone Marrow-Derived Cells Aggravates Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacterium bovis. **Front Immunol**, 8, p. 435, 2017.

BORGES DA SILVA, H.; WANG, H.; QIAN, L. J.; HOGQUIST, K. A. *et al.* ARTC2.2/P2RX7 Signaling during Cell Isolation Distorts Function and Quantification of Tissue-Resident CD8(+) T Cell and Invariant NKT Subsets. **J Immunol**, 202, n. 7, p. 2153-2163, Apr 1 2019.

BORSELLINO, G.; KLEINWIETFELD, M.; DI MITRI, D.; STERNJAK, A. *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, 110, n. 4, p. 1225-1232, Aug 15 2007.

BRAUN, N.; FENGLER, S.; EBELING, C.; SERVOS, J. *et al.* Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **Biochem J**, 351 Pt 3, n. Pt 3, p. 639-647, Nov 1 2000.

BUATOIS, V.; FAGÈTE, S.; MAGISTRELLI, G.; CHATEL, L. *et al.* Pan-CC chemokine neutralization restricts splenocyte egress and reduces inflammation in a model of arthritis. **J Immunol**, 185, n. 4, p. 2544-2554, Aug 15 2010.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**, 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007. Review.

CACCAMO, N.; SIRECI, G.; MERAVIGLIA, S.; DIELI, F. *et al.* gammadelta T cells condition dendritic cells in vivo for priming pulmonary CD8 T cell responses against Mycobacterium tuberculosis. **Eur J Immunol**, 36, n. 10, p. 2681-2690, Oct 2006.

CERAMI, A.; BEUTLER, B. The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. **Immunol Today**, 9, n. 1, p. 28-31, Jan 1988.

CHALMIN, F.; MIGNOT, G.; BRUCHARD, M.; CHEVRIAUX, A. *et al.* Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. **Immunity**, 36, n. 3, p. 362-373, Mar 23 2012.

CHIACCHIO, T.; CASETTI, R.; BUTERA, O.; VANINI, V. *et al.* Characterization of regulatory T cells identified as CD4(+)CD25(high)CD39(+) in patients with active tuberculosis. **Clin Exp Immunol**, 156, n. 3, p. 463-470, Jun 2009.

CORBETT, E. L. HIV and tuberculosis: surveillance revisited. **Int J Tuberc Lung Dis**, 7, n. 8, p. 709, Aug 2003.

CORRIDEN, R.; CHEN, Y.; INOUE, Y.; BELDI, G. *et al.* Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. **J Biol Chem**, 283, n. 42, p. 28480-28486, Oct 17 2008.

CSÓKA, B.; SELMECZY, Z.; KOSCSÓ, B.; NÉMETH, Z. H. *et al.* Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. **Faseb j**, 26, n. 1, p. 376-386, Jan 2012.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. **The Biology of Infection**. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013 Nov 16;5(1):e2013070. eCollection 2013. 2035-3006 (Print) 2035-3006 (Linking).

DHEDA, K.; BOOTH, H.; HUGGETT, J. F.; JOHNSON, M. A. *et al.* Lung Remodeling in Pulmonary Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, 192, n. 7, p. 1201-1210, 2005.

DI VIRGILIO, F. P2X receptors and inflammation. **Curr Med Chem**, 22, n. 7, p. 866-877, 2015.

DI VIRGILIO, F.; DAL BEN, D.; SARTI, A. C.; GIULIANI, A. L. *et al.* The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**, 47, n. 1, p. 15-31, Jul 18 2017.

DIEL, R.; GOLETTI, D.; FERRARA, G.; BOTHAMLEY, G. *et al.* Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. **Eur Respir J**, 37, n. 1, p. 88-99, Jan 2011.

DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. **Semin Immunol**, 26, n. 3, p. 203-209, Jun 2014.

DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. **Semin Immunopathol**, 38, n. 2, p. 153-166, Mar 2016.

DUBOIS-COLAS, N.; PETIT-JENTREAU, L.; BARREIRO, L. B.; DURAND, S. *et al.* Extracellular adenosine triphosphate affects the response of human macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. **J Infect Dis**, 210, n. 5, p. 824-833, Sep 1 2014.

DWYER, K. M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D. *et al.* CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signal**, 3, n. 1-2, p. 171-180, Mar 2007.

ELTZSCHIG, H. K.; IBLA, J. C.; FURUTA, G. T.; LEONARD, M. O. *et al.* Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. **J Exp Med**, 198, n. 5, p. 783-796, Sep 1 2003.

ELTZSCHIG, H. K.; THOMPSON, L. F.; KARHAUSEN, J.; COTTA, R. J. *et al.* Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. **Blood**, 104, n. 13, p. 3986-3992, Dec 15 2004.

ELTZSCHIG, H. K.; WEISSMÜLLER, T.; MAGER, A.; ECKLE, T. Nucleotide metabolism and cell-cell interactions. **Methods Mol Biol**, 341, p. 73-87, 2006.

ERNST, P. B.; GARRISON, J. C.; THOMPSON, L. F. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. **J Immunol**, 185, n. 4, p. 1993-1998, Aug 15 2010.

FAAS, M. M.; SÁEZ, T.; DE VOS, P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? **Mol Aspects Med**, 55, p. 9-19, Jun 2017.

FENHALLS, G.; STEVENS, L.; BEZUIDENHOUT, J.; AMPHLETT, G. E. *et al.* Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. **Immunology**, 105, n. 3, p. 325-335, Mar 2002.

FREDHOLM, B. B.; AP, I. J.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K. N. *et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**, 53, n. 4, p. 527-552, Dec 2001.

GRIFFITHS, G.; NYSTRÖM, B.; SABLE, S. B.; KHULLER, G. K. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. **Nat Rev Microbiol**, 8, n. 11, p. 827-834, 11 2010.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol**, 25, n. 1, p. 33-39, Jan 2004.

HASKÓ, G.; PACHER, P. Regulation of macrophage function by adenosine. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 32, n. 4, p. 865-869, Apr 2012.

HEINE, P.; BRAUN, N.; HEILBRONN, A.; ZIMMERMANN, H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. **Eur J Biochem**, 262, n. 1, p. 102-107, May 1999.

HEINE, P.; BRAUN, N.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S. C. *et al.* The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. **Eur J Biochem**, 268, n. 2, p. 364-373, Jan 2001.

HICKS-BERGER, C. A.; CHADWICK, B. P.; FRISCHAUF, A. M.; KIRLEY, T. L. Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). **J Biol Chem**, 275, n. 44, p. 34041-34045, Nov 3 2000.

JAYACHANDRAN, R.; SUNDARAMURTHY, V.; COMBALUZIER, B.; MUELLER, P. *et al.* Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. **Cell**, 130, n. 1, p. 37-50, Jul 13 2007.

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, 1, n. 1, p. 20-30, 2001. Research Support, Non-U S Gov't Review.

KAUFMANN, S. H. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, 6, n. 9, p. 699-704, 09 2006.

KAUFMANN, S. H. Tuberculosis vaccine development: strength lies in tenacity. **Trends Immunol**, 33, n. 7, p. 373-379, 2012. Research Support, Non-U S Gov't Review.

KAUFMANN, S. H.; BAUMANN, S.; NASSER EDDINE, A. Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, 10, n. 10, p. 1068-1079, Oct 2006.

KAUFMANN, S. H.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P. H. New vaccines for tuberculosis. **Lancet**, 375, n. 9731, p. 2110-2119, 2010. Comment Research Support, N I H , Extramural Research Support, Non-U S Gov't Review.

KHADER, S. A.; BELL, G. K.; PEARL, J. E.; FOUNTAIN, J. J. *et al.* IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nat Immunol**, 8, n. 4, p. 369-377, 2007. Research Support, N I H , Extramural Research Support, Non-U S Gov't.

KIM, K.; PERERA, R.; TAN, D. B.; FERNANDEZ, S. *et al.* Circulating mycobacterial-reactive CD4+ T cells with an immunosuppressive phenotype are higher in active tuberculosis than latent tuberculosis infection. **Tuberculosis (Edinb)**, 94, n. 5, p. 494-501, Sep 2014.

KUKULSKI, F.; BAHRAMI, F.; BEN YEBDRI, F.; LECKA, J. *et al.* NTPDase1 controls IL-8 production by human neutrophils. **J Immunol**, 187, n. 2, p. 644-653, Jul 15 2011.

KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; LAVOIE, E. G.; LECKA, J. *et al.* Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. **Purinergic Signal**, 1, n. 2, p. 193-204, Jun 2005.

KWAN, C. K.; ERNST, J. D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. **Clin Microbiol Rev**, 24, n. 2, p. 351-376, Apr 2011.

LAZENNEC, G.; RICHMOND, A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. **Trends Mol Med**, 16, n. 3, p. 133-144, Mar 2010.

LINDEN, J.; KOCH-NOLTE, F.; DAHL, G. Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. **Annu Rev Immunol**, 37, p. 325-347, Apr 26 2019.

LÉVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S. C. *et al.* NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. **Eur J Immunol**, 40, n. 5, p. 1473-1485, May 2010.

MARCUS, A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSOPOULOS, J. H.; ISLAM, N. *et al.* The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. **J Clin Invest**, 99, n. 6, p. 1351-1360, Mar 15 1997.

MARIATHASAN, S.; WEISS, D. S.; NEWTON, K.; MCBRIDE, J. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, 440, n. 7081, p. 228-232, Mar 9 2006.

MARQUES, R. E.; GUABIRABA, R.; RUSSO, R. C.; TEIXEIRA, M. M. Targeting CCL5 in inflammation. **Expert Opin Ther Targets**, 17, n. 12, p. 1439-1460, Dec 2013.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol**, 15, n. 11, p. 599-607, Nov 2005.

MATEO, J.; HARDEN, T. K.; BOYER, J. L. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. **Br J Pharmacol**, 128, n. 2, p. 396-402, Sep 1999.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G. B.; HIROTA, S. A. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, 330, n. 6002, p. 362-366, 2010. Research Support, Non-U S Gov't.

MIZUMOTO, N.; KUMAMOTO, T.; ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J. *et al.* CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. **Nat Med**, 8, n. 4, p. 358-365, 2002. Research Support, Non-U S Gov't Research Support, U S Gov't, P H S.

MULERO, J. J.; YEUNG, G.; NELKEN, S. T.; FORD, J. E. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. **J Biol Chem**, 274, n. 29, p. 20064-20067, Jul 16 1999.

NASCIMENTO, D. C.; VIACAVA, P. R.; FERREIRA, R. G.; DAMACENO, M. A. *et al.* Sepsis expands a CD39(+) plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. **Immunity**, 54, n. 9, p. 2024-2041.e2028, Sep 14 2021. ORGANIZATION, W. H. Global Tuberculosis Report 2020. 2020.

ORME, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. **Nat Immunol**, 16, n. 1, p. 57-63, Jan 2015.

PAN, H.; YAN, B. S.; ROJAS, M.; SHEBZUKHOV, Y. V. *et al.* *Ipr1* gene mediates innate immunity to tuberculosis. **Nature**, 434, n. 7034, p. 767-772, Apr 7 2005.

PANDEY, A. K.; SASSETTI, C. M. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 11, p. 4376-4380, Mar 2008.

PETERS, W.; ERNST, J. D. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect**, 5, n. 2, p. 151-158, 2003. Research Support, Non-U S Gov't

Research Support, U S Gov't, P H S

Review.

PETIT-JENTREAU, L.; JOUVION, G.; CHARLES, P.; MAJLESSI, L. *et al.* Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Deficiency in *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Mice Enhances Neutrophil Recruitment. **Infect Immun**, 83, n. 9, p. 3666-3674, Sep 2015.

PETROVIC-DJERGOVIC, D.; HYMAN, M. C.; RAY, J. J.; BOUIS, D. *et al.* Tissue-resident ecto-5' nucleotidase (CD73) regulates leukocyte trafficking in the ischemic brain. **J Immunol**, 188, n. 5, p. 2387-2398, Mar 1 2012.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. **Annu Rev Pathol**, 7, p. 353-384, 2012.

REILEY, W. W.; CALAYAG, M. D.; WITTMER, S. T.; HUNTINGTON, J. L. *et al.* ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection are initiated in the mediastinal lymph nodes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 31, p. 10961-10966, Aug 2008.

REUTERSHAN, J.; VOLLMER, I.; STARK, S.; WAGNER, R. *et al.* Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. **Faseb j**, 23, n. 2, p. 473-482, Feb 2009.

RISSIEK, B.; LUKOWIAK, M.; RACZKOWSKI, F.; MAGNUS, T. *et al.* In Vivo Blockade of Murine ARTC2.2 During Cell Preparation Preserves the Vitality and Function of Liver Tissue-Resident Memory T Cells. **Front Immunol**, 9, p. 1580, 2018.

ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; SAUNDERS, B.; FRANCE, M. P. *et al.* Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. **J Exp Med**, 193, n. 2, p. 239-246, Jan 2001.

ROMAGNOLI, A.; ETNA, M. P.; GIACOMINI, E.; PARDINI, M. *et al.* ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. **Autophagy**, 8, n. 9, p. 1357-1370, Sep 2012.

RUSSELL, D. G.; CARDONA, P. J.; KIM, M. J.; ALLAIN, S. *et al.* Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nat Immunol**, 10, n. 9, p. 943-948, Sep 2009.

SACCHETTINI, J. C.; RUBIN, E. J.; FREUNDLICH, J. S. Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator Mycobacterium tuberculosis. **Nat Rev Microbiol**, 6, n. 1, p. 41-52, Jan 2008.

SANTIAGO-CARVALHO, I.; DE ALMEIDA-SANTOS, G.; BOMFIM, C. C. B.; DE SOUZA, P. C. *et al.* P2x7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis. **Front Cell Infect Microbiol**, 11, p. 672472, 2021.

SAUNDERS, B. M.; BRITTON, W. J. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. **Immunol Cell Biol**, 85, n. 2, p. 103-111, 2007 Feb-Mar 2007.

SAVIO, L. E. B.; DE ANDRADE MELLO, P.; FIGLIUOLO, V. R.; DE AVELAR ALMEIDA, T. F. *et al.* CD39 limits P2X7 receptor inflammatory signaling and attenuates sepsis-induced liver injury. **J Hepatol**, 67, n. 4, p. 716-726, Oct 2017.

SCHAIBLE, U. E.; STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P. H.; RUSSELL, D. G. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. **J Immunol**, 160, n. 3, p. 1290-1296, Feb 1998.

SHIEH, C. H.; HEINRICH, A.; SERCHOV, T.; VAN CALKER, D. *et al.* P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF- α in cultured mouse microglia. **Glia**, 62, n. 4, p. 592-607, Apr 2014.

SHKURUPIY, V. A.; KIM, L. B.; POTAPOVA, O. V.; CHERDANTSEVA, L. A. *et al.* Fibrogenesis in granulomas and lung interstitium in tuberculous inflammation in mice. **Bull Exp Biol Med**, 156, n. 6, p. 731-735, Apr 2014.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases1. **Biochim Biophys Acta**, 1386, n. 1, p. 65-78, Jul 28 1998.

SYNNESTVEDT, K.; FURUTA, G. T.; COMERFORD, K. M.; LOUIS, N. *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. **J Clin Invest**, 110, n. 7, p. 993-1002, Oct 2002.

TROMBETTA, E. S.; HELENIUS, A. Glycoprotein reglucosylation and nucleotide sugar utilization in the secretory pathway: identification of a nucleoside diphosphatase in the endoplasmic reticulum. **Embo j**, 18, n. 12, p. 3282-3292, Jun 15 1999.

TSAI, M. C.; CHAKRAVARTY, S.; ZHU, G.; XU, J. *et al.* Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. **Cell Microbiol**, 8, n. 2, p. 218-232, Feb 2006.

VAN DER WEL, N.; HAVA, D.; HOUBEN, D.; FLUITSMA, D. *et al.* M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. **Cell**, 129, n. 7, p. 1287-1298, Jun 29 2007.

VLAJKOVIC, S. M.; HOUSLEY, G. D.; GREENWOOD, D.; THORNE, P. R. Evidence for alternative splicing of ecto-ATPase associated with termination of purinergic transmission. **Brain Res Mol Brain Res**, 73, n. 1-2, p. 85-92, Nov 10 1999.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase. **J Biol Chem**, 271, n. 17, p. 9898-9901, Apr 26 1996.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. **J Biol Chem**, 273, n. 18, p. 11392-11399, May 1 1998.

YEUNG, G.; MULERO, J. J.; MCGOWAN, D. W.; BAJWA, S. S. *et al.* CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. **Biochemistry**, 39, n. 42, p. 12916-12923, Oct 24 2000.

YOUNG, D. B.; PERKINS, M. D.; DUNCAN, K.; BARRY, C. E., 3RD. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **J Clin Invest**, 118, n. 4, p. 1255-1265, 2008. Research Support, Non-U S Gov't

Review.

ZANIN, R. F.; BRAGANHOL, E.; BERGAMIN, L. S.; CAMPESATO, L. F. *et al.* Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. **PLoS One**, 7, n. 2, p. e31205, 2012.

8. Apêndices

- 8.1. Apêndice A: A inibição do receptor P2X7R como estratégia para inibir a morte celular durante a digestão pulmonar e processamento para obtenção de suspensões celulares para citometria de Fluxo.**

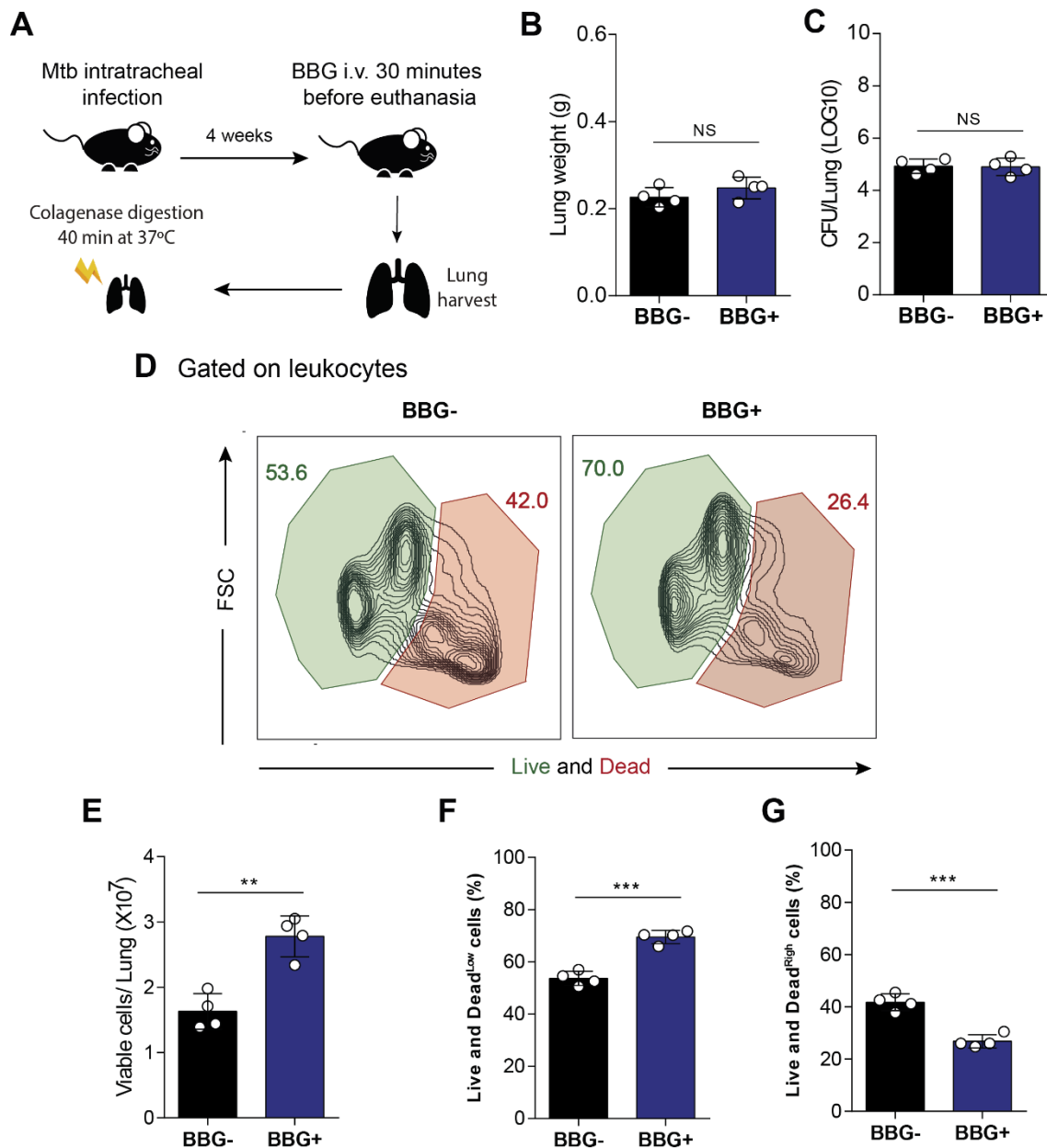
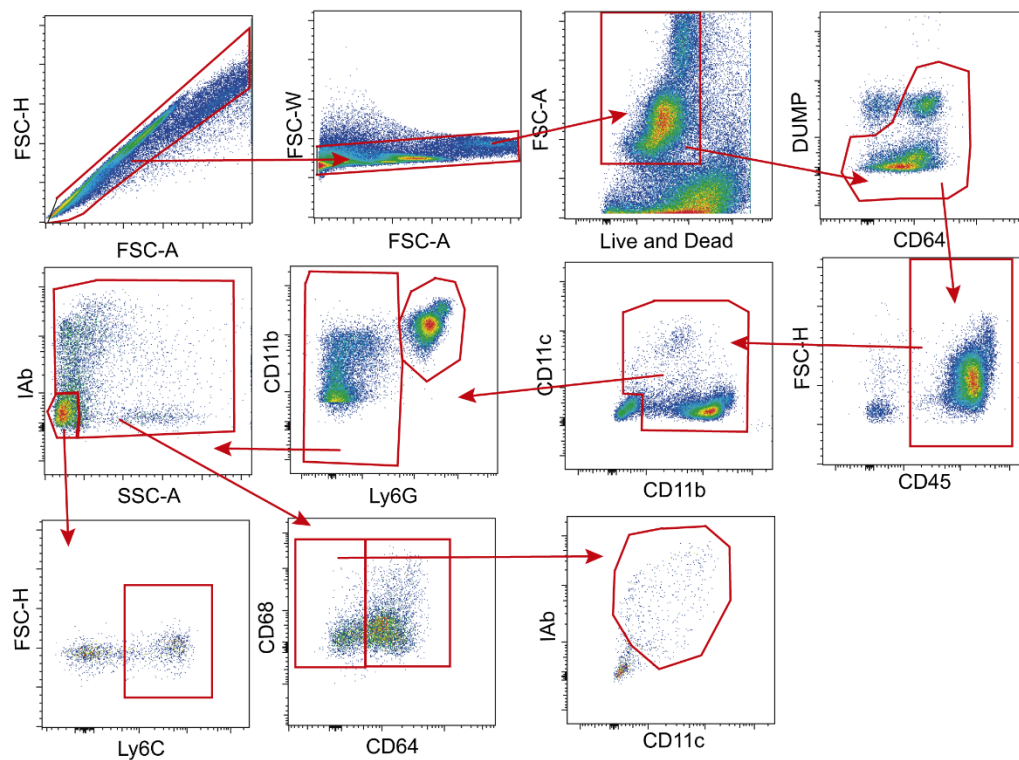


Figura 16. A inibição do receptor P2X7R previne a morte celular durante a digestão pulmonar e processamento para obtenção de suspensões celulares para Citometria de Fluxo. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 100 bacilos Mtb M299. 28 dias p.i. recebeu 45mg/Kg de tratamento com BBG 30 minutos antes eutanásia e o pulmão foi digerido com collagenase IV. Representação esquemática do protocolo experimental (A). Peso do pulmão e UFC são mostrados (B e C). Gráficos de contorno mostram a frequência de células positivas e negativas vivas e mortas (D). Número de recuperação viável célula por pulmão (E). Frequências de células viáveis (F). Frequências de células mortas (G). Diferenças significativas observados entre os grupos estão indicados por ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com quatro a cinco camundongos em cada grupo.

8.2. Apêndice B: Estratégia de análise da citometria de fluxo.

A



B

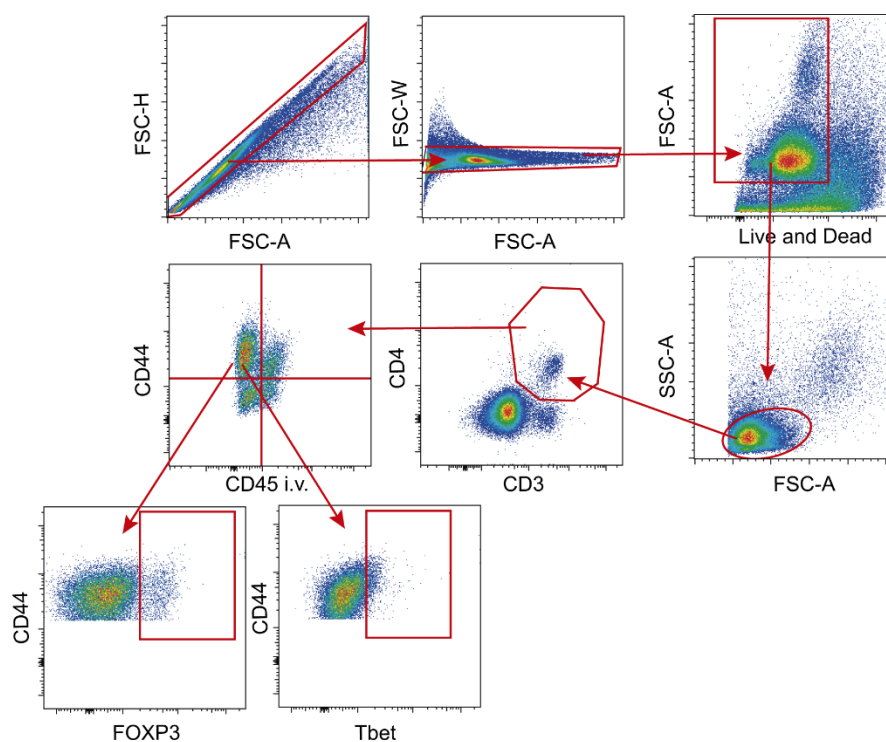


Figura 17. Estratégia de análise de células mielóides e células T CD4⁺ e CD8⁺ em camundongos C57BL/6 e *Entpd1*^{-/-} infectados com a cepa M299. Estratégias para avaliar as células Ly6G⁺Ly6C^{Low}CD11b⁺, Ly6G⁻Ly6C^{high}CD11b⁺, Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺F4/80⁺CD11b⁺ e Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺CD11b⁺ são mostradas. (B) Estratégias de gate para avaliar CD4⁺, CD8⁺, CD44⁺CD4⁺ e as células T CD44⁺CD8⁺ são mostradas.

8.3. Apêndice C: P2x7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis.



P2x7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis

OPEN ACCESS

Edited by:

Selvakumar Subbian,
Public Health Research Institute
(PHRI), United States

Reviewed by:

Noria Segueni,
Artimmune SAS, France
Monica Varela,
Leiden University, Netherlands

*Correspondence:

Caio César Barbosa Bomfim
caiocesarbonfim@usp.br
Maria Regina D'Império Lima
relima@usp.br

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Clinical Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 25 February 2021

Accepted: 20 April 2021

Published: 05 May 2021

Citation:

Santiago-Carvalho I,
Almeida-Santos G, Bomfim CCB,
Souza PC, Silva JCS,
Melo BMS, Amaral EP, Cione MVP,
Lasunskaja E, Hirata MH,
Alves-Filho JCF, Nakaya HI,
Alvarez JM and D'Império Lima MR
(2021) P2x7 Receptor Signaling
Blockade Reduces Lung
Inflammation and Necrosis During
Severe Experimental Tuberculosis.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:672472.
doi: 10.3389/fcimb.2021.672472

Igor Santiago-Carvalho^{1†}, Gislane de Almeida-Santos^{1†}, Caio César Barbosa Bomfim^{1*†}, Paula Carolina de Souza¹, Juan Carlo Santos e Silva², Bruno Marcel Silva de Melo³, Eduardo Pinheiro Amaral⁴, Marcos Vinícios Pinheiro Cione¹, Elena Lasunskaja⁵, Mario Hiroyuki Hirata², José Carlos Farias Alves-Filho³, Helder Imoto Nakaya², José Maria Alvarez¹ and Maria Regina D'Império Lima^{1*}

¹ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil,

² Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), USP, São Paulo, Brazil,

³ Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, Brazil, ⁴ Immunobiology Section, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States, ⁵ Laboratório de Biologia do Reconhecer, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil

The risk of developing severe forms of tuberculosis has increased by the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) epidemic, lack of effective drugs to eliminate latent infection and the emergence of drug-resistant mycobacterial strains. Excessive inflammatory response and tissue damage associated with severe tuberculosis contribute to poor outcome of the disease. Our previous studies using mice deficient in the ATP-gated ionotropic P2X7 receptor suggested this molecule as a promising target for host-directed therapy in severe pulmonary tuberculosis. In this study, we assessed the effects of P2X7 pharmacological blockade on disease severity. First, we observed an increase in *P2RX7* gene expression in the peripheral blood of tuberculosis patients compared to healthy donors. Lung leukocytes of mice infected with hypervirulent mycobacteria also showed increased expression of the P2X7 receptor. P2X7 blockade in mice with advanced tuberculosis recapitulated in many aspects the disease in P2X7-deficient mice. P2X7-directed therapy reduced body weight loss and the development of inflammatory and necrotic lung lesions, as well as delayed mycobacterial growth. Lower TNF- α production by lung cells and a substantial reduction in the lung GR-1⁺ myeloid cell population were observed after P2X7 inhibition. The effector CD4⁺ T cell population also decreased, but IFN- γ production by lung cells increased. The presence of a large population with characteristics of myeloid dendritic cells, as well as the increase in IL-6 production by lung cells, also indicate a qualitative improvement in the pulmonary immune response due to P2X7 inhibition. These findings support the use of drugs that target the P2X7 receptor as a therapeutic strategy to improve the outcome of pulmonary tuberculosis.

Keywords: tuberculosis, lung damage, adjuvant treatment, P2X7 receptor, host-direct therapies

HIGHLIGHTS

The P2X7 receptor detects ATP released during stress or cell death and activates the NLRP3 inflammasome, leading to mature IL-1 β and IL-18 secretion and cell death by pyroptosis. Notably, prolonged stimuli of the P2X7 receptor induce necrotic cell death due to formation of large pores in the cell membrane. The P2X7 receptor has been previously suggested as a promising target candidate for host-directed therapies in severe pulmonary tuberculosis. In this study, we provide proof of concept for this approach in mice infected with hypervirulent mycobacteria. P2X7-directed therapy administered over a short period of time in mice with advanced pulmonary tuberculosis was effective in reducing disease severity. This therapeutic strategy can be particularly useful, combined with anti-microbial drugs, to interrupt the vicious cycle of uncontrolled inflammatory response and damage to lung tissue in severe forms of the disease.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is an airborne infectious disease that remains as one of the major causes of health threat (World Health Organization, 2020). In 2019, the estimated number of fatal cases resulting from *Mycobacterium tuberculosis* infection reached 1.4 million worldwide, making TB one of the top ten causes of global death (World Health Organization, 2020). Multiple immune evasion strategies developed along the coevolution of mycobacteria with the vertebrate host, such as the interference with antigen presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, explain the limited success of vaccines against TB (Ernst, 2018). TB control is also hampered by the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) epidemic, lack of effective drugs to eliminate latent infection as well as the emergence of drug-resistant mycobacterial strains (Shah et al., 2007; World Health Organization, 2020). Failure to prevent and control *M. tuberculosis* infection increases the risk of developing severe forms of TB (Caws et al., 2008; Bell and Noursadeghi, 2018). Severe disease is commonly associated with exacerbated lung inflammation and necrosis, resulting in serious sequelae for TB patients.

This emerging scenario has encouraged the combined use of standard anti-microbial treatments for TB with host-directed therapies based on anti-inflammatory interventions. This therapeutic approach directly targets the inflammatory response triggered by the infection to prevent and repair tissue damage, promote pathogen elimination and reduce disease sequelae (Kaufmann et al., 2014; Zumla et al., 2016; Tsenova and Singhal, 2020). Accelerating the patient healing and reducing the adverse effects of anti-microbial drugs are both desirable outcomes of adjunctive therapies (Hawn et al., 2013; Tobin, 2015). Current clinical experience of anti-inflammatory therapy in TB is mostly with corticosteroids, which have been successfully used to treat tuberculous meningitis and pericarditis, as well as to ameliorate paradoxical HIV-TB immune reconstitution inflammatory syndrome (Prasad et al., 2016; Kaufmann et al., 2018; Schutz et al., 2018). In pulmonary TB, the benefits of corticosteroid treatment are limited to clinical parameters, such as fever

reduction and weight gain (Bilaçeroğlu et al., 1999). Thus, it would be of great interest to establish new therapeutic approaches to protect lung tissue from the harmful effects of uncontrolled inflammation caused by *M. tuberculosis* infection.

Our previous studies have highlighted the extracellular ATP sensing by the P2X7 receptor cation channel as a promising target candidate for host-directed therapies in severe pulmonary TB (Amaral et al., 2014; Bomfim et al., 2017). Although a protective role in extra pulmonary TB has been attributed to the P2X7 receptor (Fernando et al., 2007), its effect on patients with severe pulmonary disease is unknown. ATP released at high concentrations during cell stress or death acts as a damage signal and activates the P2X7 receptor. The influx of Ca²⁺ and efflux of K⁺ cause cytoplasmic ionic changes, which lead to NLRP3-inflammasome activation and culminates in mature IL-1 β and IL-18 secretion and cell death through pyroptosis (Mariathasan et al., 2006; Iyer et al., 2009). Importantly, prolonged stimuli of the P2X7 receptor induce necrotic cell death due to formation of large membrane pores (Di Virgilio et al., 1989; Di Virgilio et al., 2017). P2X7 deficiency, particularly in bone marrow-derived cells, improves lung disease in mice infected with hypervirulent mycobacteria by reducing the inflammatory response, necrotic lesions and bacterial load (Amaral et al., 2014; Bomfim et al., 2017). P2X7 signaling aggravates lung disease by promoting the lysis of infected macrophages, facilitating bacterial release in the extracellular milieu (Amaral et al., 2014; Bomfim et al., 2017). In addition, the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in the lungs has been shown to be dependent on P2X7 activation (Bomfim et al., 2017). This population of immature myeloid cells migrates from the bone marrow to the lungs when the disease gets worse and becomes a permissive niche for the replication of the bacillus, allowing the spread of the infection in the lungs (Knaut et al., 2014; Tsiganov et al., 2014; Lovewell et al., 2020; Barbosa Bomfim et al., 2021).

In this study, we evaluated the effects of pharmacological blockade of the P2X7 receptor on severe pulmonary TB. First, the *P2RX7* gene expression was assessed in the peripheral blood of TB patients using a public transcriptome database. The presence of the P2X7 receptor in lung leukocytes was evaluated in C57BL/6 mice infected with hypervirulent mycobacteria. The effects of P2X7 blockade in the advanced stage of the disease were then investigated in this experimental model of severe pulmonary TB. Our findings demonstrate that the *P2RX7* gene and P2X7 protein are highly expressed in human and murine TB, respectively. P2X7 inhibition prevents disease progression and is a promising approach to be used as a host-directed therapy for severe forms of pulmonary TB.

MATERIALS AND METHODS

Transcriptome Analysis of Human Peripheral Blood

Human transcriptome data were analyzed using R. Raw data downloaded using *GEOquery* (Davis and Meltzer, 2007) obtained from the GEO datasets (GEO accession number: GSE54992). Two classes of samples were used: healthy donors as control ($N = 6$) and active TB ($N = 9$). Array quality control was applied using *arrayQualityMetrics* (Kauffmann et al., 2009)

to identify outliers. Expression data were normalized using RMA function from the *affy* (Gautier et al., 2004). Probes matching for the same gene were collapsed by taking the highest expression across the samples. Differential expression analyses were performed using *limma* (Ritchie et al., 2015). The differentially expressed genes (DEGs) were plotted with \log_2 fold-change and the $-\log_{10} P$ adjusted value. The package *ComplexHeatmap* (Gu et al., 2016) was used to plot the expression patterns.

Mice

Specific pathogen-free C57BL/6 male (6-8-week-old) mice were bred at the isogenic mouse facility, ICB, USP. After infection, mice were maintained in micro isolator cages with *ad libitum* feed at the Biosafety Level 3 facility, FCF, USP. All procedures were performed in accordance with national regulations of the ethical guidelines for mouse experimentation with permit number 5611150818 and 136/2017.

Mycobacterial Culture and Mouse Infection

The frozen bacilli were thawed and grow in Middlebrook 7H9 medium enriched with 10% (vol/vol) ADC (albumin, dextrose, catalase) (Difco, BD Biosciences, USA), 0.4% (mass/vol) sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, USA) and 0.05% (vol/vol) Tween 80 (Sigma-Aldrich), and maintained at 37°C for 7 days until mid-log phase (OD 0.6 – 0.9). Bacterial concentration was determined using a spectrophotometer at 600 nm. Mice were anesthetized intraperitoneally (i.p.) with ketamine (Vetbrands, Brazil; 100 mg/kg) and xylazine (Vetbrands; 15 mg/kg) and infected intratracheally (i.t.) with ~100 bacilli of the *Mycobacterium bovis* MP287/03 strain (Amaral et al., 2014).

Brilliant Blue G Treatment

For *in vivo* pharmacological blockade of the P2X7 receptor, mice were injected i.p. every 2 days with brilliant blue G (BBG, Sigma-Aldrich) (45 mg/Kg/mouse in 300 μ L of PBS), starting on day 21 of infection.

Lung Macroscopic and Microscopic Analyses

The harvested lung lobes were washed with sterile PBS and weighed. The lung relative mass was calculated by dividing the mean of lung weight in experimental mice by the mean of lung weight in uninfected controls. The right lung upper lobe was maintained in 10% buffer formalin, photographed and subsequently embedded in paraffin. Histological sections of approximately 4-5 μ m were stained using the hematoxylin-eosin (HE) method for tissue morphological analysis and the Ziehl Neelsen (ZN) method for mycobacterial visualization. The microscopic analyses were performed with a Leica microscope (Germany), and images were captured with a Nikon camera (Japan).

Lung Cell Harvesting and Counting

The lung lobes were dissected and digested with collagenase type IV (0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich) in RPMI 1640 medium (Gibco, USA) at 37°C for 40 minutes under agitation (200 rpm) (Amaral et al., 2019b). The lung cells were dissociated by passage through a 100 μ m

pore-size cell strainer and incubated with ACK Lysing Buffer (Thermo Fisher Scientific, USA) at room temperature for one minute to deplete the erythrocytes. The lung cell suspensions were washed with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco) in PBS following centrifugation at 1,200 rpm for 5 minutes and resuspended in RPMI 1640 medium enriched with 10% FCS and 0.1% gentamicin (Gibco). The viable lung cell numbers were determined using trypan blue exclusion assay and a hemocytometer.

Flow Cytometry Analysis

Lung cells (1×10^6 cells/well) were seeded in round-bottom 96-well plates and stained using fluorochrome-labeled monoclonal antibodies to CD45 (30-F11), CD11b (M1/70), CD11c (N418), GR1 (RB6-8C5), CD4 (RM4.5), CD44 (IM7), CD69 (H1.2F3), P2X7 (1F11), lineage (CD4- RM4-5; CD8-S3-6.7; CD19 - 1D3 and NK.1 - PK136 (BD Biosciences). Live/dead dye (Thermo Fisher Scientific) was used to stain dead cells, as described in data sheet. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and analyzed with the LSRFortessa™ flow cytometer (BD Biosciences – USA) and the FlowJo 10.4.2 software (BD Biosciences). The gate strategy for analysis of CD11b⁺ myeloid cells and CD4⁺ T cells are shown in the **Supplementary Figures 1A, B**.

Colony-Forming Unit (CFU) Counting

Serial dilutions of lung homogenates were cultured in 6-well plates with Middlebrook 7H10 Agar supplemented with 10% (vol/vol) OADC (oleate, albumin, dextrose and catalase) (Difco, BD Biosciences) and 0.4% (mass/vol) sodium pyruvate, at 37°C for 21 days. CFUs were counted visually.

Cytokine Quantification

Cells (1×10^6 cells/well) harvested from the lungs were cultured in sterile round-bottom 96-well plates in complete RPMI 1640 medium enriched with 10% FCS, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 0.05% gentamicin for 48 hours at 37°C and 5% CO₂. The supernatants were collected, filtered and the concentrations of TNF- α , IL-6, IL-10 and IFN- γ cytokines were determined using the appropriated Mouse ELISA kit, as described in data sheet (BD OptEIA, USA).

Statistical Analyses

Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism 6 software. Data were described as mean \pm standard error. The Mann-Whitney non-parametric T test was used to assess differences between two groups. The one-way ANOVA and Tukey's *post hoc* tests were used to compare three or more groups. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Increased Expression of the P2RX7 Gene in the Peripheral Blood of TB Patients and the P2X7 Receptor on Lung Leukocytes of Mice With Severe TB

To investigate whether the P2RX7 gene was expressed differently in TB patients, we re-analyzed the peripheral blood transcriptome

data from healthy individuals and patients with the active disease (Cai et al., 2014). Among the P2X family members, only the *P2RX7* gene was upregulated in TB patients when compared to healthy individuals (mean \log_2 fold-change = 1.58, adjusted *P* value = 1.81×10^{-4}) (Figure 1A). Next, we assessed the expression of the P2X7 receptor on lung cells isolated from C57BL/6 mice infected i.t. with ~100 *M. bovis* bacilli of the hypervirulent MP287/03 strain. This experimental model proved to be useful to understand the role of P2X7 receptor in the development of severe forms of pulmonary TB (Amaral et al., 2014; Bomfim et al., 2017). As previously reported, C57BL/6 mice developed severe pneumonia characterized at day 28 p.i. by increased lung weight, high bacterial load and intense leukocyte infiltration (Figure 1B), as well as extensive areas of intra-granulomatous necrosis (Figure 1C). Immunofluorescence analysis of lung tissue revealed many cells expressing the P2X7 receptor in infected and uninfected mice; the expression level was apparently higher in infected mice (Figure 1D). P2X7 upregulation was confirmed by flow cytometry analysis, showing higher P2X7 expression on lung leukocytes isolated from infected mice compared to uninfected mice (Figure 1E). Increased P2X7 expression can make immune cells highly responsive to extracellular ATP, as previously reported in experimental models of autoimmune disease and malaria (Proietti et al., 2014; Salles et al., 2017).

Protective Effects of P2X7 Pharmacological Blockade on the Development of Severe Pulmonary TB in Mice

To evaluate the effects of P2X7 pharmacological blockade during advanced pulmonary TB, C57BL/6 mice infected i.t. with MP287/03 mycobacteria and uninfected mice were treated i.p. with the P2X7 antagonist BBG (Figure 2A and Supplementary Figure 2A). BBG is a food additive with structure and function analogous to highly selective P2X7 antagonists, which was first used to improve tissue recovery after spinal cord injury in rats (Peng et al., 2009). P2X7-directed therapy started on day 21 p.i. when a reduction of more than 10% of body weight indicated the advanced stage of the disease (Figure 2B). Notably, P2X7 inhibition prevented body weight loss until day 28 of infection. Fewer lung white nodes and reduced lung relative masses were observed in BBG-treated mice compared to untreated animals (Figures 2C, D). Lung weight, cellularity and bacterial burden were also lower in BBG-treated mice (Figures 2E–G). In contrast, BBG treatment had no effect on lung weight and cellularity in uninfected mice (Supplementary Figures 2B, C).

Histopathological analysis on day 28 p.i. revealed better preserved lung tissue in BBG-treated mice compared to untreated controls (Figure 3A), which was corroborated by morphometric quantification of the aerated alveolar space (Figure 3B). Areas of alveolitis and necrosis were substantially reduced after P2X7 inhibition (Figure 3A). In addition, extracellular bacilli were found in abundance in necrotic lesions in untreated mice, but not in BBG-treated mice, where solid granulomas with predominantly intracellular bacilli were seen (Figure 3C). Together, these findings demonstrate that

P2X7 pharmacological blockade prevents the development of severe forms of pulmonary TB pathology in mice.

Reduced Leukocyte Recruitment in Mice With Advanced TB Treated With P2X7-Directed Therapy

The pulmonary immune response was then assessed in C57BL/6 mice infected with MP287/03 mycobacteria and treated with BBG. P2X7-directed therapy caused a substantial reduction in the recruitment of leukocyte (CD45⁺) population to the lungs (Figure 4A). Among CD11b⁺ myeloid cells, the GR1⁺ population was particularly diminished after P2X7 blockade. Notably, the population of myeloid cells expressing CD11c was increased in BBG-treated mice compared to untreated animals. Regarding CD4⁺ T cells, P2X7-directed therapy impaired the accumulation of total and CD69⁺CD44⁺ populations (Figure 4B). This phenotype is characteristic of effector CD4⁺ T cells that infiltrate the pulmonary parenchyma in mice infected with mycobacteria (Sakai et al., 2014). In the absence of infection, similar numbers of these cell populations were observed in BBG-treated and untreated mice (Supplementary Figures 2D, E). In addition, a lower concentration of TNF- α was found in lung cell supernatants from infected mice treated with BBG compared to those not treated (Figure 4C). Remarkably, low levels of IFN- γ and IL-6 were secreted by lung cells from infected mice; BBG treatment increased substantially the production of these cytokines. IL-10 was produced at similar levels by lung cells from both infected mouse groups. Comparable baseline levels of TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-10 were found in lung cell supernatants from uninfected mice, treated or not with BBG (Supplementary Figure 2F).

In resume, P2X7-directed therapy during advanced TB impairs the recruitment of GR1⁺ myeloid cells and CD4⁺ T cells to the lungs (Figure 5). The increase in a myeloid cell population with characteristics of dendritic cells, as well as in production of IFN- γ and IL-6 by lung cells, suggests a qualitative improvement in the pulmonary immune response due to P2X7 inhibition.

DISCUSSION

This study supports the use of drugs that target the P2X7 receptor as a therapeutic strategy to improve the outcome of pulmonary TB. This approach can be particularly useful, in combination with anti-microbial drugs, to interrupt the vicious cycle of uncontrolled inflammatory response and damage to lung tissue in severe forms of the disease.

Among P2X (1-7) family members, the *P2RX7* gene expression was the only one increased in peripheral blood of TB patients in relation to healthy donors. Another indication that P2X7 signaling is a promising target for host-directed therapies in pulmonary TB was the increased expression of this receptor in lung leukocytes of mice infected with hypervirulent mycobacteria. Extracellular ATP at high concentration in severe TB pneumonia could lead to strong activation of the NLRP3 inflammasome in leukocytes expressing high levels of the P2X7 receptor. The release of large amounts of pro-inflammatory cytokines and the

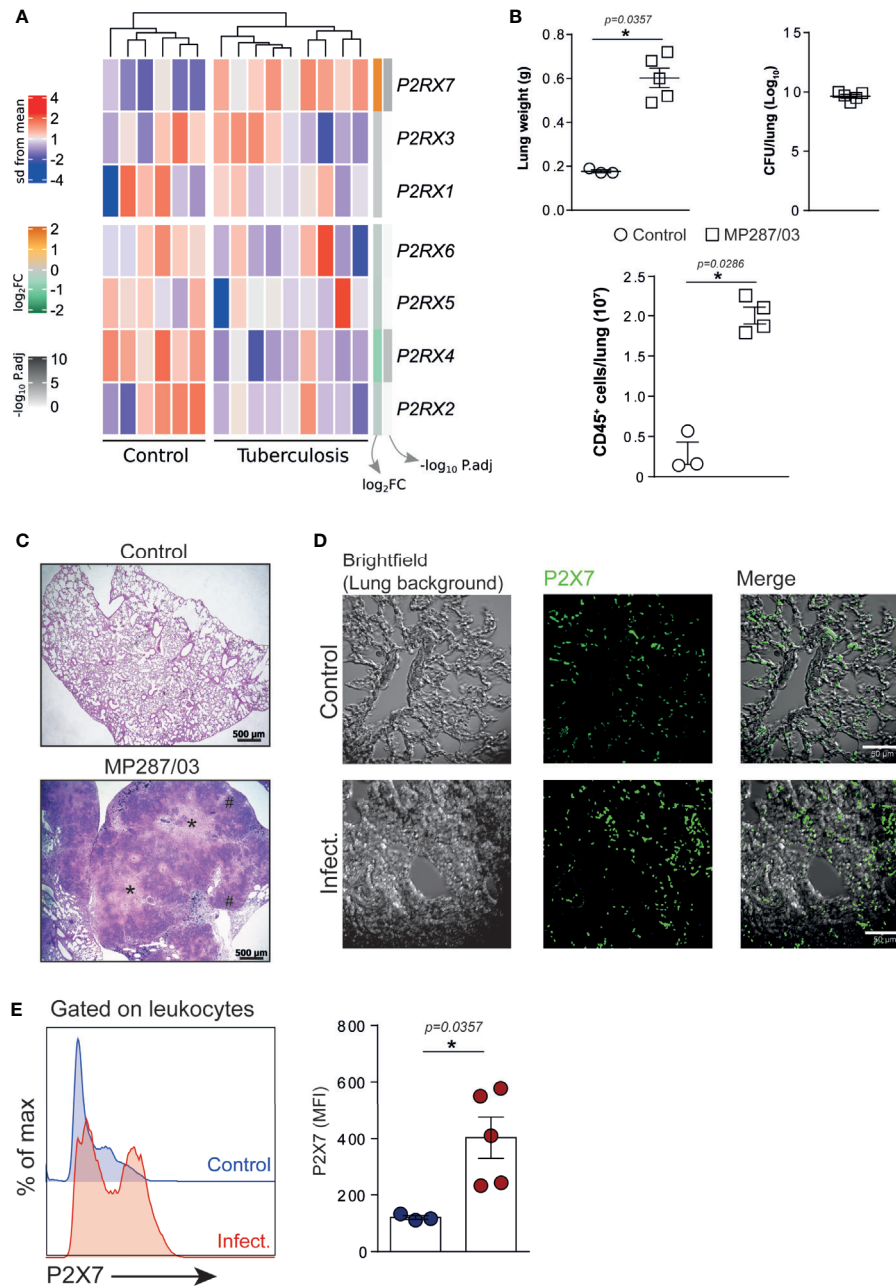
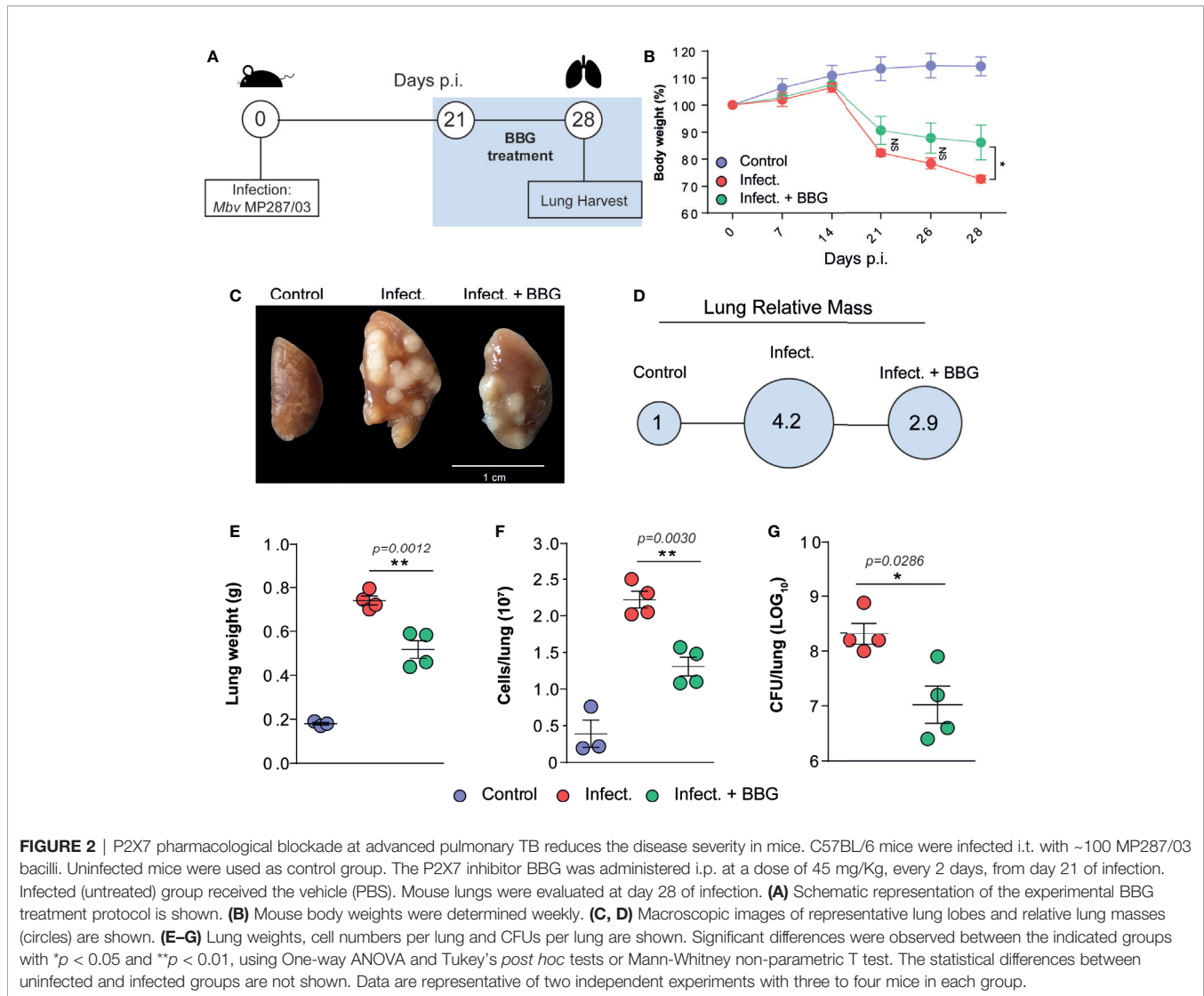


FIGURE 1 | The expression of *P2RX7* gene and P2X7 receptor is increased in the peripheral blood of TB patients and on lung leukocytes of mice with severe TB. **(A)** Gene expression counts were z-score normalized across all samples. \log_2 fold-change and $-\log_{10}$ P. adjust from DEG analysis are shown in the right annotation of the heat map. Genes were ordered by hierarchical clustering (Euclidean distance). **(B–E)** C57BL/6 mice were infected i.t. with ~100 MP287/03 bacilli. Uninfected mice were used as control group. Mouse lungs were evaluated at day 28 of infection. **(B)** Lung weights, CFUs per lung and leukocyte (CD45⁺) cell numbers per lung are shown. **(C)** Representative lung sections stained with hematoxylin-eosin method (scale bars correspond to 500 μ m) of infected and control group. Asterisks (*) indicate necrotic areas and hash signs (#) indicate alveolitis. **(D)** Immunofluorescence staining for the P2X7 receptor (green) in representative lung sections (scale bars correspond to 50 μ m). **(E)** Histograms show P2X7 expression in lung leukocytes. Mean fluorescence intensities (MFIs) of P2X7 expression are shown in the bar graph. Significant differences were observed between indicated groups with $*p < 0.05$, using Mann-Whitney non-parametric T test. Data are representative of two independent experiments with three to five mice in each group.

pyroptotic death of numerous immune cells would be expected in this scenario. In addition, both gasdermin D cleaved by caspase-1 and pannexin-1 activated by the influx of Ca^{2+} form pores in the

cell membrane, allowing ATP release in the extracellular environment (Locovei et al., 2006; Shi et al., 2015; Sborgi et al., 2016). Accumulation of extracellular ATP may boost the



inflammatory response and promote tissue damage. Extracellular ATP in millimolar concentrations induces pore formation and necrotic cell death through P2X7 activation (Di Virgilio et al., 1989; Di Virgilio et al., 2017). By inhibiting the P2X7 signaling pathway these processes can be interrupted.

P2X7 pharmacological blockade in mice with advanced pulmonary TB recapitulated in many aspects the disease in P2X7-deficient mice infected with hypervirulent mycobacteria (Amaral et al., 2014). P2X7-directed therapy administered over a short period of time was effective in reducing body weight loss and the development of inflammatory and necrotic lung lesions, as well as delaying mycobacterial growth. The reduction in body weight loss in infected mice treated with P2X7 inhibitor may result from the lower production of TNF- α by lung leukocytes, as this cytokine was originally identified by its ability to induce cachexia (Cerami and Beutler, 1988). The decrease in pulmonary necrotic lesions may be due to the inhibition of necrotic cell death, as a consequence of P2X7 signaling blockade. Specifically, P2RX7^{-/-} macrophages infected with hypervirulent mycobacteria are more

resistant to cell death induced by high levels of extracellular ATP and release fewer bacteria to the extracellular milieu than wild-type macrophages (Amaral et al., 2014). Supporting this *in vitro* finding, fewer extracellular bacilli were found in the lung tissue when the P2X7 receptor was inhibited *in vivo*.

The reduction in tissue damage and bacterial load, leading to less stimulation of the immune system by damage and pathogen-associated molecular patterns, may explain the limited areas of lung inflammation in infected mice given the P2X7-directed therapy. A similar approach in which ferroptosis was inhibited in mice acutely infected with *M. tuberculosis* also reduces lung inflammatory lesions and mycobacterial burden (Amaral et al., 2019a). P2X7 signaling blockade may reduce the release of damage signals, impairing the activation of macrophages and, consequently, the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α . P2X7 inhibition may also restrain the activation of NLRP3 inflammasome and the release of mature IL-1 β and IL-18, promoting control of the inflammatory response. However, on day 28 p.i. with MP287/03 mycobacteria, IL-1 β is produced at low

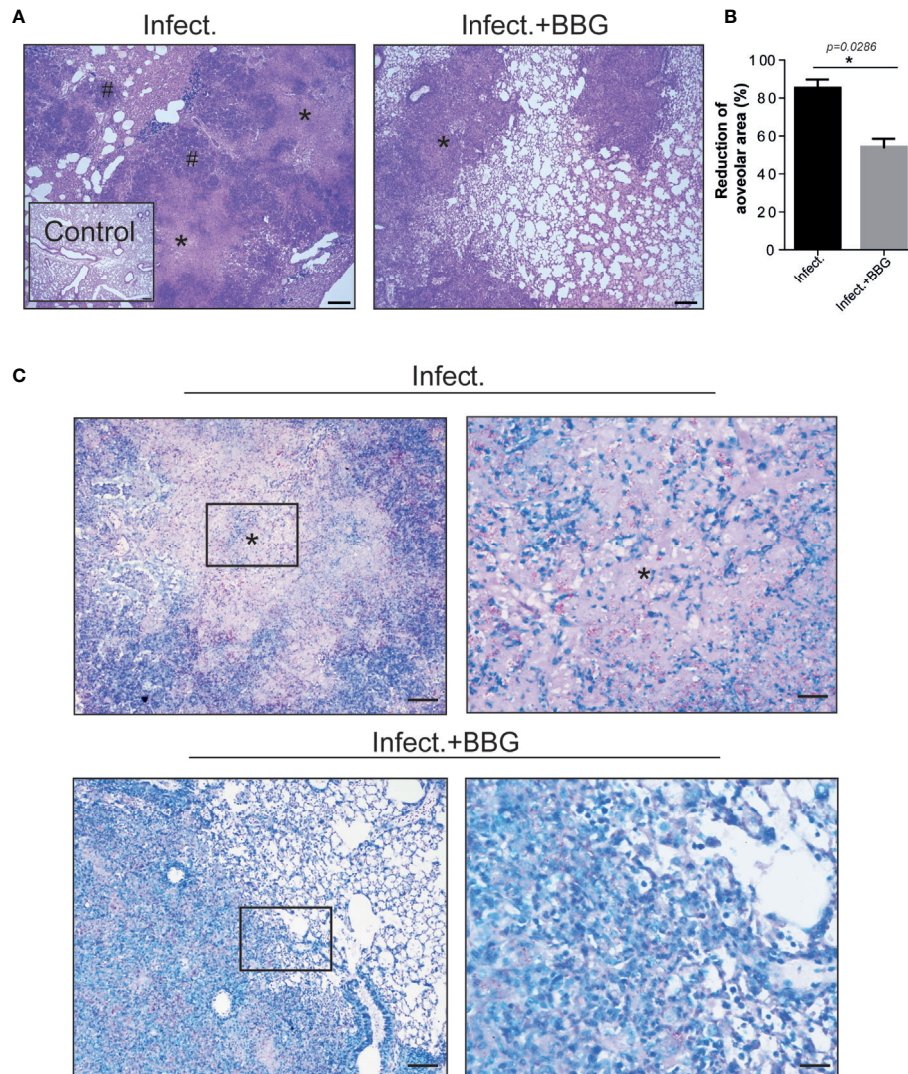


FIGURE 3 | P2X7 pharmacological blockade reduces tuberculous pulmonary lesions in mice. Histopathological changes in lungs of the BBG-treated and untreated mice, previously infected with ~100 MP287/03 bacilli, were evaluated at day 28 of infection. **(A)** Images of representative lung sections stained with hematoxylin-eosin method (scale bars correspond to 200 μ m) are shown. Asterisks (*) indicate necrotic areas and hash signs (#) indicate alveolitis. **(B)** Morphometric quantification of aerated alveolar space is shown. **(C)** Images of representative lung sections stained with Ziehl Neelsen method. Magnified areas from left squares are demonstrated in right images (scale bars correspond to 100 μ m and 25 μ m, respectively), showing large number of extracellular bacilli in necrotic regions (*) in untreated mice, whereas predominantly intracellular bacilli were seen in the BBG-treated mice. Significant differences were observed between indicated groups with * $p < 0.05$, using Mann-Whitney non-parametric T test. Data are representative of two independent experiments with four mice in each group.

levels by lung cells from both C57BL/6 and P2X7-deficient mice (Amaral et al., 2014), suggesting a minor role for this cytokine in this TB model. A direct effect of P2X7 inhibition on Ca^{2+} influx may also have impaired leukocyte activation and contributed to restrict the inflammatory response. Supporting this idea, P2X7 signaling in myeloid cells induces the expression of several chemokines that promote leukocyte recruitment, such as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1, CCL2), IL-8, CC-lygand 3 (CCL3) and CXC-lygand 2 (CXCL2), as well as the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α (Shieh et al., 2014; Di Virgilio et al., 2017). A reduction in TNF- α production due to P2X7 blockade may also have contributed to

restrain necrotic lung lesions, as excessive production of this cytokine can result in the development of tissue-damaging immunopathology (Dorhoi and Kaufmann, 2014).

The population of GR-1⁺ myeloid cells was particularly affected by P2X7 pharmacological blockade. Characterized as granulocytic myeloid-derived suppressor cells, GR-1⁺ cells accumulate massively in the lungs during the final stage of hypervirulent mycobacterial infection, promoting bacterial growth and the development of necrotizing pneumonia (Barbosa Bomfim et al., 2021). This immature myeloid cell population is generated by emergency hematopoiesis in response to excessive or chronic infections (Boettcher and Manz, 2017).

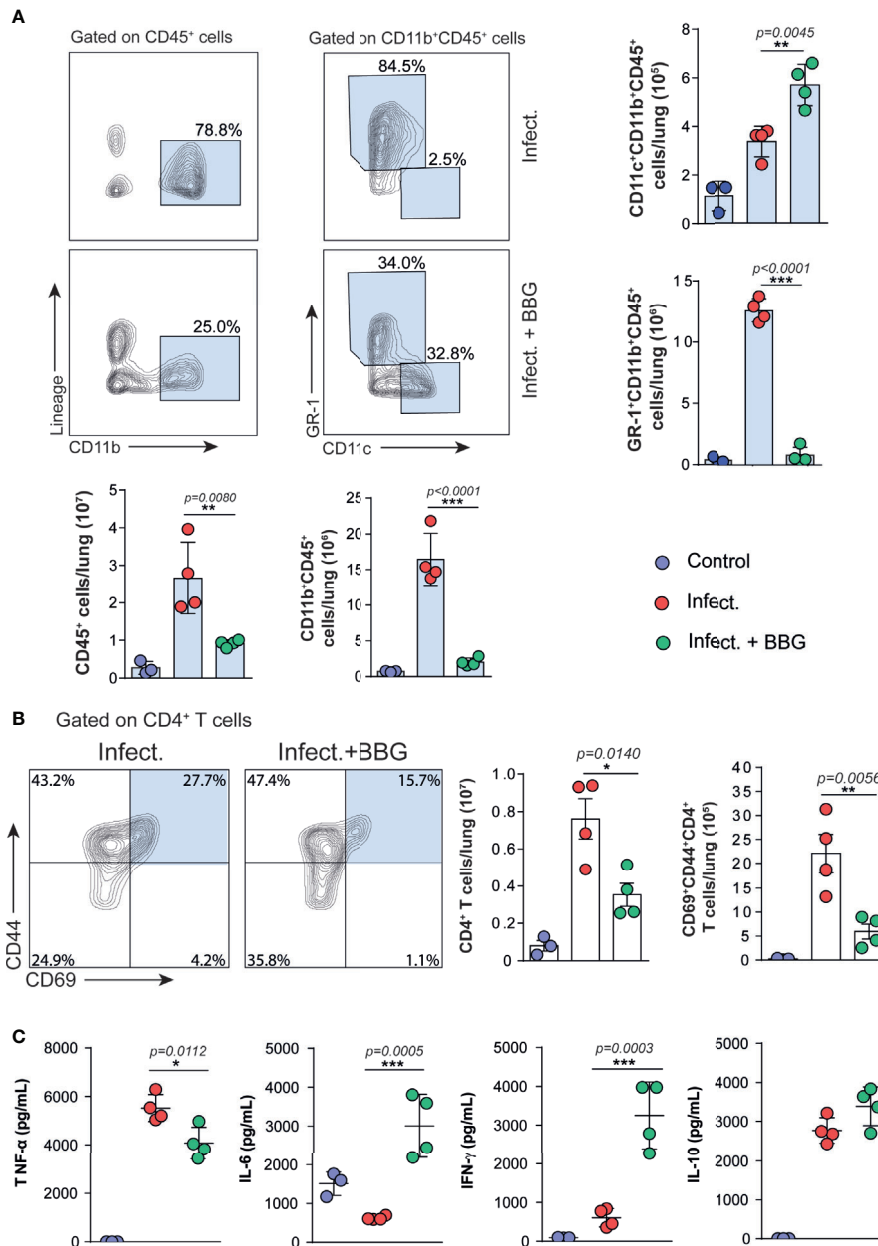
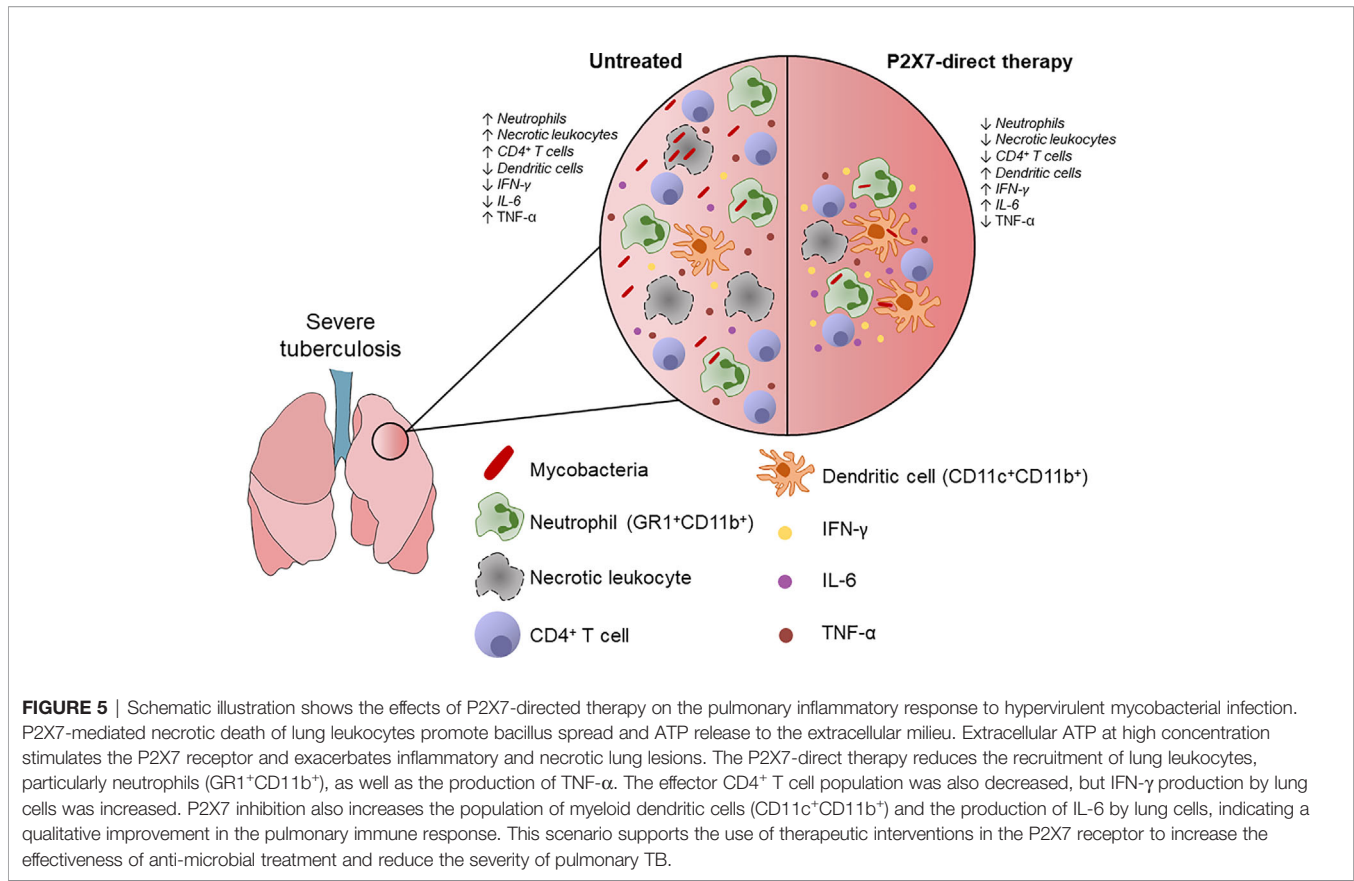


FIGURE 4 | P2X7-directed therapy reduces the pulmonary inflammatory response, but increases the population of CD11c⁺ myeloid cells and the production of IFN- γ and IL-6 by lung cells. Lung cells from BBG-treated and untreated mice were evaluated at day 28 p.i. with ~100 MP287/03 bacilli. Lung cells from uninfected mice were used as control. **(A)** Contour-plots show the expression of CD11b vs lineage in CD45⁺ cells and CD11c vs GR-1 in CD11b⁺CD45⁺ cells. Bar graphs show cell numbers per lung. **(B)** Contour-plots show CD44 and CD69 expression in CD4⁺ T cells. Bar graphs show cell numbers per lung. **(C)** Cytokine levels in 48h-culture supernatants of lung cells are shown. Significant differences were observed between the indicated groups with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, using One-way ANOVA and Tukey's *post hoc* tests. The statistical differences between uninfected and infected groups are not shown. Data are representative of two independent experiments with three to four mice in each group.

Therefore, the reduction in the GR-1⁺ cell population demonstrates the potential of P2X7-directed therapy to help healing severe pulmonary TB. The effector CD4⁺ T cell population also decreased due to P2X7 inhibition. Interestingly, elevated production of IFN- γ was found *ex vivo* in lung cell suspension of mice receiving BBG, suggesting an improvement

in the effector response of these cells and/or an increase in IFN- γ production by other cell subsets.

Adenosine, presumably generated through ATP degradation by ectonucleotidases, has been implicated in the suppression of IFN- γ production by lung CD4⁺ T cells in this experimental model of severe TB. The pharmacological inhibition of adenosine receptors



increased the frequency of IFN- γ -producing CD4⁺ T cells (Amaral et al., 2019b), which are the major source of IFN- γ in the lungs of MP287/03-infected mice at day 28 p.i. (Barbosa Bomfim et al., 2021). The protection of infected lung tissue resulting from P2X7 inhibition may prevent ATP release and, consequently, the accumulation of adenosine in the extracellular environment, leading to an increase in IFN- γ production by CD4⁺ T cells. IFN- γ production has a crucial role in resistance to *M. tuberculosis* infection (Flynn et al., 1993), and may have contributed to control the lung bacterial burden in infected mice treated with P2X7-directed therapy. The presence of a large population with characteristics of myeloid dendritic cells in the mouse lungs (Misharin et al., 2013), as well as the increased *ex vivo* production of IL-6 by lung cells, may also indicate a qualitative improvement in the pulmonary immune response due to P2X7 inhibition. Our interpretation of these findings is that the preservation of lung tissue due to P2X7 blockade in infected mice allowed the recruitment of dendritic cells from the blood to the lungs. This process occurs constantly by a steady-state bone marrow output and is rapidly intensified by pathogenic stimuli (Holt and Schon-Hegrad, 1987; McWilliam et al., 1994). Dendritic cell migration to the lungs may have been interrupted during emergency hematopoiesis in infected and untreated mice. Like macrophages, pulmonary dendritic cells produce IL-6 after stimulation (Demedts et al., 2005), and are presumably an important source of this cytokine in infected mice given P2X7-directed therapy.

Although the P2X7 receptor has been suggested previously as a promising target candidate for therapies in severe pulmonary TB (Amaral et al., 2014), our present findings provide proof of concept for this approach in mice infected with hypervirulent mycobacteria. The P2X7-directed therapy has the particularity of intervening directly to maintain the integrity of the infected lungs, avoiding the uncontrolled inflammatory response induced by extensive tissue damage. In addition, therapeutic intervention in the P2X7 receptor seems to improve the quality of the immune response to severe mycobacterial infection. A possible adverse effect of P2X7 inhibition would be the increase in mycobacterial resistance to anti-TB treatment, resulting from the limited effect of antibiotics on bacilli located in solid granulomas. However, this host-directed therapy can be decisive for a favorable outcome in severe cases if administered in conjunction with anti-TB drugs with ability to eradicate persistent bacilli, such as pyrazinamide (Whitfield et al., 2015). This therapeutic strategy can be exploited to increase the effectiveness of anti-TB treatment in severe pulmonary TB.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care Committee of Institute of Biomedical Science with permit number 5611150818 and 136/2017.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: IS-C; GA-S; CCBB; HI and MRDL. Performed the experiments: IS-C; GA-S; CCBB; PCS; BS and MP. Analyzed the data: IS-C; GA-S; CCBB; JCSS and MRDL. Contributed reagents/materials/analysis tools: IS-C; GA-S; CB; EPA; MHH; EL; JCFA-F; HIN; JMA and MRDL.

FUNDING

This study was supported in whole by São Paulo Research Foundation (FAPESP-Brazil) grants: 2015/20432-8 (MRDL), 2019/24700-8 (IS-C), 2017/11030-9 (PCS), 2019/27139-5 (JCSS) and 2020/09043-8 (CCBB); and by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grants: 408909/2018-8 (MRDL), 303810/2018-1 (MRDL) and 140666/2018-4 (GA-S). All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Amaral, E. P., Costa, D. L., Namasivayam, S., Riteau, N., Kamenyeva, O., Mittereder, L., et al. (2019a). A Major Role for Ferroptosis in Mycobacterium Tuberculosis-Induced Cell Death and Tissue Necrosis. *J. Exp. Med.* 216 (3), 556–570. doi: 10.1084/jem.20181776
- Amaral, E. P., Machado de Salles, E., Barbosa Bomfim, C. C., Salgado, R. M., Almeida, F. M., de Souza, P. C., et al. (2019b). Inhibiting Adenosine Receptor Signaling Promotes Accumulation of Effector CD4⁺ T Cells in the Lung Parenchyma During Severe Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 219 (6), 964–974. doi: 10.1093/infdis/jiy586
- Amaral, E. P., Ribeiro, S. C., Lanes, V. R., Almeida, F. M., de Andrade, M. R., Bomfim, C. C., et al. (2014). Pulmonary Infection With Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. *PLoS Pathog.* 10 (7). doi: 10.1371/journal.ppat.1004188
- Barbosa Bomfim, C. C., Pinheiro Amaral, E., Santiago-Carvalho, I., Almeida Santos, G., Machado Salles, E., Hastreiter, A. A., et al. (2021). Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria. *J. Infect. Dis.* 223 (3), 494–507. doi: 10.1093/infdis/jiaa708
- Bell, L. C. K., and Noursadeghi, M. (2018). Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium Tuberculosis Co-Infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 16 (2), 80–90. doi: 10.1038/nrmicro.2017.128
- Bilaçeroğlu, S., Perim, K., Büyüksirin, M., and Celikten, E. (1999). Prednisolone: A Beneficial and Safe Adjunct to Antituberculosis Treatment? A Randomized Controlled Trial. *Int. J. Tuberc Lung Dis.* 3 (1), 47–54.
- Boettcher, S., and Manz, M. G. (2017). Regulation of Inflammation- and Infection-Driven Hematopoiesis. *Trends Immunol.* 38 (5), 345–357. doi: 10.1016/j.it.2017.01.004
- Bomfim, C. C. B., Amaral, E. P., Cassado, A. D. A., Salles, E. M., do Nascimento, R. S., Lasunskaja, E., et al. (2017). P2X7 Receptor in Bone Marrow-Derived Cells Aggravates Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacterium Bovis. *Front. Immunol.* 8, 435. doi: 10.3389/fimmu.2017.00435

ACKNOWLEDGMENTS

We thank José Soares Ferreira Neto for providing the MP287/03 *M. bovis* strain. We are also grateful to Rogério Silva do Nascimento, José Israel Lima, Silvana Silva and Maria Áurea de Alvarenga for technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.672472/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Gate strategies for the analyses of myeloid cells and CD4⁺ T cells are shown in mice infected with MP287/03 mycobacteria, treated or not treated with BBG. C57BL/6 mice were infected i.t. with ~100 MP287/03 bacilli. Lung cells were evaluated at day 28 of infection. **(A)** Gate strategies to evaluate CD45⁺, CD45⁺Lin⁻CD11b⁺, CD45⁺Lin⁻CD11b⁺CD11c⁺, CD45⁺Lin⁻CD11b⁺GR1⁺ cells are shown. **(B)** Gate strategies to evaluate CD4⁺ T cells and CD69⁺CD44⁺CD4⁺ T cells are shown.

Supplementary Figure 2 | BBG treatment does not interfere with pulmonary immunological parameters in uninfected C57BL/6 mice. Four doses of BBG (45 mg/kg) were administered i.p. every two days in C57BL/6 mice, and lung cells were harvested 7 days after the first dose. Untreated C57BL/6 mice were used as controls. **(A)** Schematic representation of the experimental BBG treatment protocol is shown. **(B)** Lung weights are shown. **(C)** Cell numbers per lung are shown. **(D)** CD45⁺, CD11b⁺CD45⁺ and CD11c⁺CD11b⁺CD45⁺, GR1⁺CD11b⁺CD45⁺ cell numbers per lung are shown. **(E)** CD4⁺ and CD69⁺CD44⁺CD4⁺ T cell numbers per lung are shown. **(F)** Cytokine levels in 48h-culture supernatants of lung cells are shown. No significant difference was observed using Mann-Whitney non-parametric T test.

- Cai, Y., Yang, Q., Tang, Y., Zhang, M., Liu, H., Zhang, G., et al. (2014). Increased Complement C1q Level Marks Active Disease in Human Tuberculosis. *PLoS One* 9 (3), e92340. doi: 10.1371/journal.pone.0092340
- Caws, M., Thwaites, G., Dunstan, S., Hawin, T. R., Lan, N. T., Thuong, N. T., et al. (2008). The Influence of Host and Bacterial Genotype on the Development of Disseminated Disease With Mycobacterium Tuberculosis. *PLoS Pathog.* 4 (3), e1000034. doi: 10.1371/journal.ppat.1000034
- Cerami, A., and Beutler, B. (1988). The Role of Cachectin/TNF in Endotoxic Shock and Cachexia. *Immunol. Today* 9 (1), 28–31. doi: 10.1016/0167-5699(88)91353-9
- Davis, S., and Meltzer, P. S. (2007). GEOquery: A Bridge Between the Gene Expression Omnibus (GEO) and Bioconductor. *Bioinformatics* 23 (14), 1846–1847. doi: 10.1093/bioinformatics/btm254
- Demedts, I. K., Brusselle, G. G., Vermaelen, K. Y., and Pauwels, R. A. (2005). Identification and Characterization of Human Pulmonary Dendritic Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 (3), 177–184. doi: 10.1165/rcmb.2004-0279OC
- Di Virgilio, F., Bronte, V., Collavo, D., and Zanovello, P. (1989). Responses of Mouse Lymphocytes to Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate (ATP). Lymphocytes With Cytotoxic Activity are Resistant to the Permeabilizing Effects of ATP. *J. Immunol.* 143 (6), 1955–1960.
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., and Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47 (1), 15–31. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.020
- Dorhoi, A., and Kaufmann, S. H. (2014). Tumor Necrosis Factor Alpha in Mycobacterial Infection. *Semin. Immunol.* 26 (3), 203–209. doi: 10.1016/j.smim.2014.04.003
- Ernst, J. D. (2018). Mechanisms of M. tuberculosis Immune Evasion as Challenges to TB Vaccine Design. *Cell Host Microbe* 24 (1), 34–42. doi: 10.1016/j.chom.2018.06.004
- Fernando, S. L., Saunders, B. M., Sluyter, R., Skarratt, K. K., Goldberg, H., Marks, G. B., et al. (2007). A Polymorphism in the P2X(7) Gene Increases Susceptibility to Extrapulmonary Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175 (4), 360–366. doi: 10.1164/rccm.200607-970OC

- Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., and Bloom, B. R. (1993). An Essential Role for Interferon Gamma in Resistance to Mycobacterium Tuberculosis Infection. *J. Exp. Med.* 178 (6), 2249–2254. doi: 10.1084/jem.178.6.2249
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M., and Irizarry, R. A. (2004). Affy-Analysis of Affymetrix GeneChip Data At the Probe Level. *Bioinformatics* 20 (3), 307–315. doi: 10.1093/bioinformatics/btg405
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex Heatmaps Reveal Patterns and Correlations in Multidimensional Genomic Data. *Bioinformatics* 32 (18), 2847–2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313
- Hawn, T. R., Matheson, A. L., Maley, S. N., and Vandal, O. (2013). Host-Directed Therapeutics for Tuberculosis: can We Harness the Host? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (4), 608–627. doi: 10.1128/mmr.00032-13
- Holt, P. G., and Schon-Hegrad, M. A. (1987). Localization of T Cells, Macrophages and Dendritic Cells in Rat Respiratory Tract Tissue: Implications for Immune Function Studies. *Immunology* 62 (3), 349–356.
- Iyer, S. S., Pulsikens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., et al. (2009). Necrotic Cells Trigger a Sterile Inflammatory Response Through the Nlrp3 Inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (48), 20388–20393. doi: 10.1073/pnas.0908698106
- Kauffmann, A., Gentleman, R., and Huber, W. (2009). arrayQualityMetrics—A Bioconductor Package for Quality Assessment of Microarray Data. *Bioinformatics* 25 (3), 415–416. doi: 10.1093/bioinformatics/btn647
- Kaufmann, S. H. E., Dorhoi, A., Hotchkiss, R. S., and Bartenschlager, R. (2018). Host-Directed Therapies for Bacterial and Viral Infections. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (1), 35–56. doi: 10.1038/nrd.2017.162
- Kaufmann, S. H., Lange, C., Rao, M., Balaji, K. N., Lotze, M., Schito, M., et al. (2014). Progress in Tuberculosis Vaccine Development and Host-Directed Therapies—A State of the Art Review. *Lancet Respir. Med.* 2 (4), 301–320. doi: 10.1016/s2213-2600(14)70033-5
- Knaut, J. K., Jorg, S., Oberbeck-Mueller, D., Heinemann, E., Scheuermann, L., Brinkmann, V., et al. (2014). Lung-Residing Myeloid-Derived Suppressors Display Dual Functionality in Murine Pulmonary Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (9), 1053–1066. doi: 10.1164/rccm.201405-0828OC
- Locovei, S., Wang, J., and Dahl, G. (2006). Activation of Pannexin 1 Channels by ATP Through P2Y Receptors and by Cytoplasmic Calcium. *FEBS Lett.* 580 (1), 239–244. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.004
- Lovewell, R. R., Baer, C. E., Mishra, B. B., Smith, C. M., and Sasseti, C. M. (2020). Granulocytes Act as a Niche for Mycobacterium Tuberculosis Growth. *Mucosal Immunol.* 4, 229–241. doi: 10.1038/s41385-020-0300-z
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., et al. (2006). Cryopyrin Activates the Inflammasome in Response to Toxins and ATP. *Nature* 440 (7081), 228–232. doi: 10.1038/nature04515
- McWilliam, A. S., Nelson, D., Thomas, J. A., and Holt, P. G. (1994). Rapid Dendritic Cell Recruitment is a Hallmark of the Acute Inflammatory Response At Mucosal Surfaces. *J. Exp. Med.* 179 (4), 1331–1336. doi: 10.1084/jem.179.4.1331
- Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. R., and Perlman, H. (2013). Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49 (4), 503–510. doi: 10.1165/rcmb.2013-0086MA
- Peng, W., Cotrina, M. L., Han, X., Yu, H., Bekar, L., Blum, L., et al. (2009). Systemic Administration of an Antagonist of the ATP-sensitive Receptor P2X7 Improves Recovery After Spinal Cord Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (30), 12489–12493. doi: 10.1073/pnas.0902531106
- Prasad, K., Singh, M. B., and Ryan, H. (2016). Corticosteroids for Managing Tuberculous Meningitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4 (4), Cd002244. doi: 10.1002/14651858.CD002244.pub4
- Proietti, M., Cornacchione, V., Rezzonico Jost, T., Romagnani, A., Faliti, C. E., Peruzza, L., et al. (2014). ATP-Gated Ionotropic P2X7 Receptor Controls Follicular T Helper Cell Numbers in Peyer's Patches to Promote Host-Microbiota Mutualism. *Immunity* 41 (5), 789–801. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.010
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., et al. (2015). Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Res.* 43 (7), e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
- Sakai, S., Kauffman, K. D., Schenkel, J. M., McBerry, C. C., Mayer-Barber, K. D., Masopust, D., et al. (2014). Cutting Edge: Control of Mycobacterium Tuberculosis Infection by a Subset of Lung Parenchyma-Homing CD4 T Cells. *J. Immunol.* 192 (7), 2965–2969. doi: 10.4049/jimmunol.1400019
- Salles, E. M., Menezes, M. N., Siqueira, R., Borges da Silva, H., Amaral, E. P., Castillo-Mendez, S. I., et al. (2017). P2X7 Receptor Drives Th1 Cell Differentiation and Controls the Follicular Helper T Cell Population to Protect Against Plasmodium Chabaudi Malaria. *PLoS Pathog.* 13 (8), e1006595. doi: 10.1371/journal.ppat.1006595
- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., et al. (2016). GSDMD Membrane Pore Formation Constitutes the Mechanism of Pyroptotic Cell Death. *EMBO J.* 35 (16), 1766–1778. doi: 10.15252/emj.201694696
- Schutz, C., Davis, A. G., Sossen, B., Lai, R. P., Ntsekhe, M., Harley, Y. X., et al. (2018). Corticosteroids as an Adjunct to Tuberculosis Therapy. *Expert Rev. Respir. Med.* 12 (10), 881–891. doi: 10.1080/17476348.2018.1515628
- Shah, N. S., Wright, A., Bai, G. H., Barrera, L., Boulahbal, F., Martín-Casabona, N., et al. (2007). Worldwide Emergence of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (3), 380–387. doi: 10.3201/eid1303.061400
- Shieh, C. H., Heinrich, A., Serchov, T., van Calker, D., and Biber, K. (2014). P2X7-Dependent, But Differentially Regulated Release of IL-6, CCL2, and TNF- α in Cultured Mouse Microglia. *Glia* 62 (4), 592–607. doi: 10.1002/glia.22628
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., et al. (2015). Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Determines Pyroptotic Cell Death. *Nature* 526 (7575), 660–665. doi: 10.1038/nature15514
- Tobin, D. M. (2015). Host-Directed Therapies for Tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 (10). doi: 10.1101/cshperspect.a021196
- Tsenova, L., and Singhal, A. (2020). Effects of Host-Directed Therapies on the Pathology of Tuberculosis. *J. Pathol.* 250 (5), 636–646. doi: 10.1002/path.5407
- Tsiganov, E. N., Verbina, E. M., Radaeva, T. V., Sosunov, V. V., Kosmiadi, G. A., Nikitina, I. Y., et al. (2014). Gr-1dimCD11b+ Immature Myeloid-Derived Suppressor Cells But Not Neutrophils Are Markers of Lethal Tuberculosis Infection in Mice. *J. Immunol.* 193 (7), 3675–3682. doi: 10.1093/immuni.1301365
- Whitfield, M. G., Soeters, H. M., Warren, R. M., York, T., Sampson, S. L., Streicher, E. M., et al. (2015). A Global Perspective on Pyrazinamide Resistance: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 10 (7), e0133869. doi: 10.1371/journal.pone.0133869
- World Health Organization (2020). *Global Tuberculosis Report 2020*. Geneva.
- Zumla, A., Rao, M., Dodoo, E., and Maeurer, M. (2016). Potential of Immunomodulatory Agents as Adjunct Host-Directed Therapies for Multidrug-Resistant Tuberculosis. *BMC Med.* 14, 89. doi: 10.1186/s12916-016-0635-1

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Santiago-Carvalho, Almeida-Santos, Bomfim, Souza, Silva, Melo, Amaral, Cione, Lasunskaja, Hirata, Alves-Filho, Nakaya, Alvarez and D'Império Lima. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

8.4. Apêndice D: Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria.

Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria

Caio César Barbosa Bomfim,^{1,✉} Eduardo Pinheiro Amaral,² Igor Santiago-Carvalho,¹ Gislane Almeida Santos,¹ Érika Machado Salles,¹ Araceli Aparecida Hastreiter,³ Rogério Silva do Nascimento,¹ Fabrício M. Almeida,⁴ Thatiana Lopes Biá Ventura Simão,⁴ Andreza Linhares Rezende,⁴ Mario Hiroyuki Hirata,³ Ricardo Ambrósio Fock,³ José Maria Álvarez,¹ Elena B. Lasunskaja,^{4,a} and Maria Regina D'Império Lima^{1,a}

¹Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Immunobiology Section, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, ³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, and ⁴Laboratório de Biologia do Reconhecer, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

Background. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in patients with severe tuberculosis who suffer from uncontrolled pulmonary inflammation caused by hypervirulent mycobacterial infection remains unclear.

Methods. This issue was addressed using C57BL/6 mice infected with highly virulent *Mycobacterium bovis* strain MP287/03.

Results. CD11b⁺GR1^{int} population increased in the bone marrow, blood and lungs during advanced disease. Pulmonary CD11b⁺GR1^{int} (Ly6G^{int}Ly6C^{int}) cells showed granularity similar to neutrophils and expressed immature myeloid cell markers. These immature neutrophils harbored intracellular bacilli and were preferentially located in the alveoli. T-cell suppression occurred concomitantly with CD11b⁺GR1^{int} cell accumulation in the lungs. Furthermore, lung and bone marrow GR1⁺ cells suppressed both T-cell proliferation and interferon γ production in vitro. Anti-GR1 therapy given when MDSCs infiltrated the lungs prevented expansion and fusion of primary pulmonary lesions and the development of intragranulomatous caseous necrosis, along with increased mouse survival and partial recovery of T-cell function. Lung bacterial load was reduced by anti-GR1 treatment, but mycobacteria released from the depleted cells proliferated extracellularly in the alveoli, forming cords and clumps.

Conclusions. Granulocytic MDSCs massively infiltrate the lungs during infection with hypervirulent mycobacteria, promoting bacterial growth and the development of inflammatory and necrotic lesions, and are promising targets for host-directed therapies.

Keywords. tuberculosis; hypervirulent mycobacteria; myeloid-derived suppressor cells; lung damage; immunomodulation.

Tuberculosis is among the top 10 causes of death worldwide, with approximately 1.3 million fatal cases annually [1]. *Mycobacterium tuberculosis* is primarily responsible for tuberculosis in humans, but other mycobacterial species belonging to *M. tuberculosis* complex such as *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, and *Mycobacterium canettii*, can also cause the disease [2]. Host immune response is critical for eliminating or containing the pathogen within granulomas for long periods of time [3, 4]. Deficiencies in host defense promote the transition from latent to active tuberculosis and the rapid progression and dissemination of the disease in severe cases [5–7]. Treatment failure resulting from multiple drug resistance enhances the risk of developing aggressive forms of tuberculosis, which is characterized by uncontrolled pulmonary

inflammation and widespread tissue necrosis [8, 9]. A better understanding of the immunopathogenesis of severe tuberculosis is essential to design new therapeutic interventions targeting the host immune response to reduce tissue injury.

Despite the important role of the innate immune response in controlling tuberculosis, recent studies indicate that immature myeloid cell subpopulations contribute to worsening the disease [10–12]. These subpopulations, collectively named myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), were described first in cancer and then in other pathological conditions, such as infectious diseases, autoimmune diseases, obesity and pregnancy [13]. MDSCs are a heterogeneous group of immature myeloid CD11b⁺ cells with a potential ability to suppress T-cell responses [14]. According to relative expression of the surface markers Ly6C and Ly6G, murine MDSCs are subdivided into 2 major subsets, monocytic and granulocytic MDSCs (M-MDSCs and G-MDSCs, respectively). M-MDSCs express high levels of Ly6C and are negative for Ly6G, whereas G-MDSCs express low levels of Ly6C and intermediate levels of Ly6G [10, 15]. Interestingly, an early-stage MDSC population unable to suppress T-cell responses in humans and a small population of immature eosinophils

Received 26 May 2020; editorial decision 5 November 2020; accepted 11 November 2020; published online November 18, 2020.

[✉]E. B. L. and M. R. D. L. contributed equally to this work.

Correspondence: Caio César Barbosa Bomfim, Av Prof Lineu Prestes, 1730, 05508-000, São Paulo, Brazil (caiocezarbomfim@usp.br).

The Journal of Infectious Diseases® 2021;223:494–507

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiaa708

with immunosuppressive activity in *Staphylococcus aureus*-infected mice were also identified [16, 17]. The immunosuppressive activity of MDSCs operates via several mechanisms, such as degradation of essential nutrients for T-cell function, induction of regulatory cells, expression of negative immune check-point molecules, generation of adenosine and production of anti-inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and nitric oxide [18].

The role of MDSCs in tuberculosis pathogenesis has been reported in *M. tuberculosis*-susceptible mice, such as mice deficient in key immunoprotective molecules (inducible nitric oxide synthase [iNOS]^{-/-} and recombination-activating gene [RAG]^{-/-}) or with genetic polymorphisms that weaken natural immunity (I/St, 129S2, and C3HeB/FeJ) [10–12]. On infection with virulent H37Rv mycobacteria, tuberculosis-susceptible mice developed necrotizing pneumonia associated with early death. Depletion of GR1⁺ cells reduced lung inflammation and rescued 129S2 mice from lethal tuberculosis [11]. However, the role of MDSCs in immunocompetent hosts with severe tuberculosis is still unclear. This information is crucial to determine whether patients in the advanced stage of the disease can benefit from therapies directed against MDSCs [19, 20]. A balanced immune response is important for a favorable tuberculosis outcome, while uncontrolled inflammation promotes tissue necrosis, compromises lung function, and causes patient death [21]. MDSCs play a key role in dampening excessive inflammation in sepsis and pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* [22, 23]. The accumulation of MDSCs in heavily inflamed and damaged tissues may represent an effort by the host to regulate exacerbated T-helper (Th) 1 responses [24, 25].

Similar to rapidly progressive forms of pulmonary tuberculosis in immunocompetent patients, a low dose of intratracheal infection with the hypervirulent *M. bovis* strain MP287/03 induces extensive areas of pneumonia and pulmonary necrosis in C57BL/6 mice [26, 27]. The present study used this experimental model to investigate the role of MDSCs in severe tuberculosis with extensive damage to the lung tissue. Massive infiltration of G-MDSCs into the lungs in the advanced stage of MP287/03 infection promoted mycobacterial growth and the development of inflammatory and necrotic pulmonary lesions. Our findings support the use of therapies targeting MDSCs to improve the outcome of severe tuberculosis associated with uncontrolled pulmonary inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Specific pathogen-free C57BL/6 mice (6–8-week old) were bred at the isogenic mice facility of the Biomedical Science Institute, University of São Paulo, Brazil. After infection, mice were maintained in microisolator cages as described elsewhere [28]. All procedures were performed in accordance with national regulations of the ethical guidelines for mouse experimentation (permit no. 31/2016).

Mycobacteria and Mouse Infection

The hypervirulent MP287/03 *M. bovis* strain isolated from cattle was provided by José Soares Ferreira Neto (Full professor at Veterinary Medical Institute, University of São Paulo, Brazil). The H37Rv *M. tuberculosis* strain was obtained from the American Type Culture Collection. Frozen bacilli were thawed and cultured as described elsewhere [27]. Bacterial concentrations were measured using a spectrophotometer at 600 nm. Mice were anesthetized and infected intratracheally with approximately 100 bacilli [26]. Mycobacterial load was estimated using serial dilutions [27].

Cell Harvesting from Lung, Bone Marrow, and Blood

Lung cells were harvested as described elsewhere [27]. Bone marrow cells were harvested from femurs and tibias. Blood was collected via cardiac puncture in the presence of 0.03-mg/mL heparin (Merck). Erythrocytes in cell suspensions were lysed using ACK buffer (Thermo Fisher Scientific).

Phenotypic Cell Analysis

Lung, bone marrow, and blood cells were labeled with the appropriated combination of monoclonal antibodies listed in the [Supplementary Methods](#). The sample processing, intracellular interferon (IFN) γ staining and flow cytometry analysis (conventional and *t*-distributed stochastic neighbor embedding) are detailed in the [Supplementary Methods](#).

GR1⁺ Cell Enrichment and Functional Assays

GR1⁺ cells were obtained from the lungs and bone marrow using magnetic cell sorting, as described in the [Supplementary Methods](#).

Cytokine Quantification

Lung cells were cultured for 48 hours, as described elsewhere [26]. Cytokine levels in cell supernatants were quantified using the Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit (BD Bioscience).

Lung Macroscopic Analysis and Histopathology

The right upper lung lobe was preserved in 10% paraformaldehyde and subsequently photographed. Histopathological and immunohistochemical analyses are described in the [Supplementary Methods](#).

Gene Expression Measurement Using RT-PCR

Total RNA was isolated from the right lung postcaval lobe using TRIzol (Thermo Fisher Scientific) and the RNeasy Mini kit (Qiagen), as detailed in the [Supplementary Methods](#).

In Vivo GR1⁺ Cell Depletion

Mice were treated with rat anti-GR1 antibodies (RB6-8C5; immunoglobulin (Ig) G2b isotype) (0.2 mg per mouse) from day 21 to day 28 after infection, every 72 hours. The control group received rat serum IgG2b (0.2 mg per mouse) under similar conditions.

Blood Leukocyte Quantification

The blood leukocyte analysis was performed using a panoptical fast staining kit (Laborclin).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad), as described in the [Supplementary Methods](#).

RESULTS

Migration of CD11b⁺GR1^{int} Myeloid Cells Into Lungs During Severe Tuberculosis Caused by Hypervirulent MP287/03 Mycobacteria

To evaluate the myeloid cell response during severe tuberculosis, lung-infiltrating CD11b⁺ cells were analyzed in C57BL/6 mice at days 21 and 28 after infection with approximately 100 bacilli of hypervirulent MP287/03 *M. bovis* strain or reference virulent H37Rv *M. tuberculosis* strain. Confirming our group's previous findings [26–28], MP287/03-infected mice displayed accentuated body weight loss starting 21 days after infection ([Figure 1A](#)). Macroscopic observation revealed white nodules in the lungs at day 21 after infection, which were more prominent 28 days after infection ([Figure 1B](#)). Concomitant with bacterial growth, lung weights and relative masses also increased in MP287/03-infected mice ([Figure 1C](#) and [Supplementary Figure 1A](#)). During this period, focal granulomatous lesions containing bacilli progressed rapidly to extensive pneumonia with areas of necrosis ([Figure 1D](#) and [Supplementary Figure 1B](#)), significantly reducing aerated alveolar space and increasing lung-infiltrating cell numbers ([Supplementary Figure 1C](#) and [1D](#)). Bone marrow and blood cellularity also augmented in MP287/03 infection ([Supplementary Figure 1E](#)). Notably, an increase in the lung CD11b⁺ population expressing low levels of the granulocytic marker GR1 accompanied the worsening of the disease ([Figure 2A](#) and [2B](#), and [Supplementary Figure 1F](#)). This phenotype is a feature of monocytes and immature myeloid cells, including M-MDSCs and G-MDSCs [29, 30]. The GR1^{int} population was also enlarged in the bone marrow and blood during severe tuberculosis, although less than the GR1^{hi} population ([Figure 2A](#), [2C](#), and [2D](#)). In contrast, H37Rv infection caused mild pulmonary inflammation with no increase in the GR1^{int} population ([Figures 1D](#) and [2A–2D](#)). These data suggest that CD11b⁺GR1^{int} cells are produced in the bone marrow and migrate via the bloodstream to the lungs in the advanced stage of severe tuberculosis, as demonstrated for other pathological conditions [31].

Massive Infiltration of Lungs and Harboring of Intracellular Bacilli by CD11b⁺GR1^{int} Cells Expressing G-MDSC Phenotype

Experiments were next performed to elucidate the monocytic or granulocytic origin of GR1^{int} cells that infiltrated the lungs during severe tuberculosis. On day 28 after infection, lung Ly6G⁺ and Ly6C⁺ populations were much larger in MP287/03-infected mice than in H37Rv-infected mice and noninfected

controls, and the Ly6G⁺ population predominated only in mice with severe tuberculosis ([Figure 3A](#) and [Supplementary Figure 1F](#)). Lung GR1^{hi} and GR1^{int} cells were identified, respectively, as granulocytes (Ly6G⁺SSC^{hi}) and monocytes/macrophages (Ly6C⁺SSC^{low}) in H37Rv-infected mice and noninfected controls. In contrast, these populations expressed both Ly6G and Ly6C markers and showed high granularity in MP287/03-infected mice.

Pulmonary CD45⁺ leukocytes in infected and noninfected mice were concatenated into a single file for *t*-distributed stochastic neighbor embedding analysis of the hematopoietic progenitor markers CD117 (c-kit), CD124 (interleukin Ra [IL-4Rα]) and CD135 (Flt-3). A major cluster of GR1^{hi} cells was identified in H37Rv-infected mice and noninfected controls ([Figure 3B](#)). In contrast, MP287/03-infected mice lacked the GR1^{hi} cluster and presented 3 exclusive GR1^{int} populations. Concatenated GR1⁺ clusters of infected and noninfected mice were analyzed for CD117, CD124, and CD135 expression and cell size ([Figure 3C](#)). All GR1^{int} populations of MP287/03-infected mice showed higher levels of CD117 and CD135 than the GR1^{hi} cluster of noninfected controls, but only one population expressed CD124. The 2 GR1⁺CD117⁺CD124⁻CD135⁺ populations primarily differed in cell size (forward scatter).

To investigate the behavior of immature myeloid cells during severe tuberculosis, their location in the lung tissue and ability to harbor intracellular bacilli were assessed by histopathological analysis on day 28 after infection with MP287/03 mycobacteria. Inflammatory cells, mainly represented by immature polymorphonuclear leukocytes exhibiting unilobed or ring-shaped nuclei, were recruited into the lungs and infected shortly after transmigration through the vascular endothelium ([Figure 3D](#)). The lung tissue presented many necrotic cells releasing intracellular bacteria. Immunohistochemical staining revealed transmigrating GR1⁺ cells and intra-alveolar GR1⁺ cell clusters in areas of alveolitis. Weak staining for the GR1 marker was observed surrounding necrotic lesions. Taken together, these results show that lung CD11b⁺GR1^{int} cells generated during MP287/03 infection have phenotype and morphology consistent with G-MDSCs, are permissive to mycobacterial infection, and are located preferentially in the pulmonary alveoli.

Suppression of T-Cell Responses by CD11b⁺GR1^{int} Cells Generated During Severe Tuberculosis

An immunosuppressed environment was established in parallel with CD11b⁺GR1^{int} cell accumulation in the lungs. Both messenger RNA and protein levels of IFN-γ and interleukin 17A in lung cell preparations decreased from day 21 to 28 after infection with MP287/03 mycobacteria ([Figure 4A](#)). Interleukin 10 protein levels were found enhanced only for MP287/03-infected mice at day 28 after infection, demonstrating predominance of an immunosuppressive environment in advanced disease. In addition, high tumor necrosis factor α production in

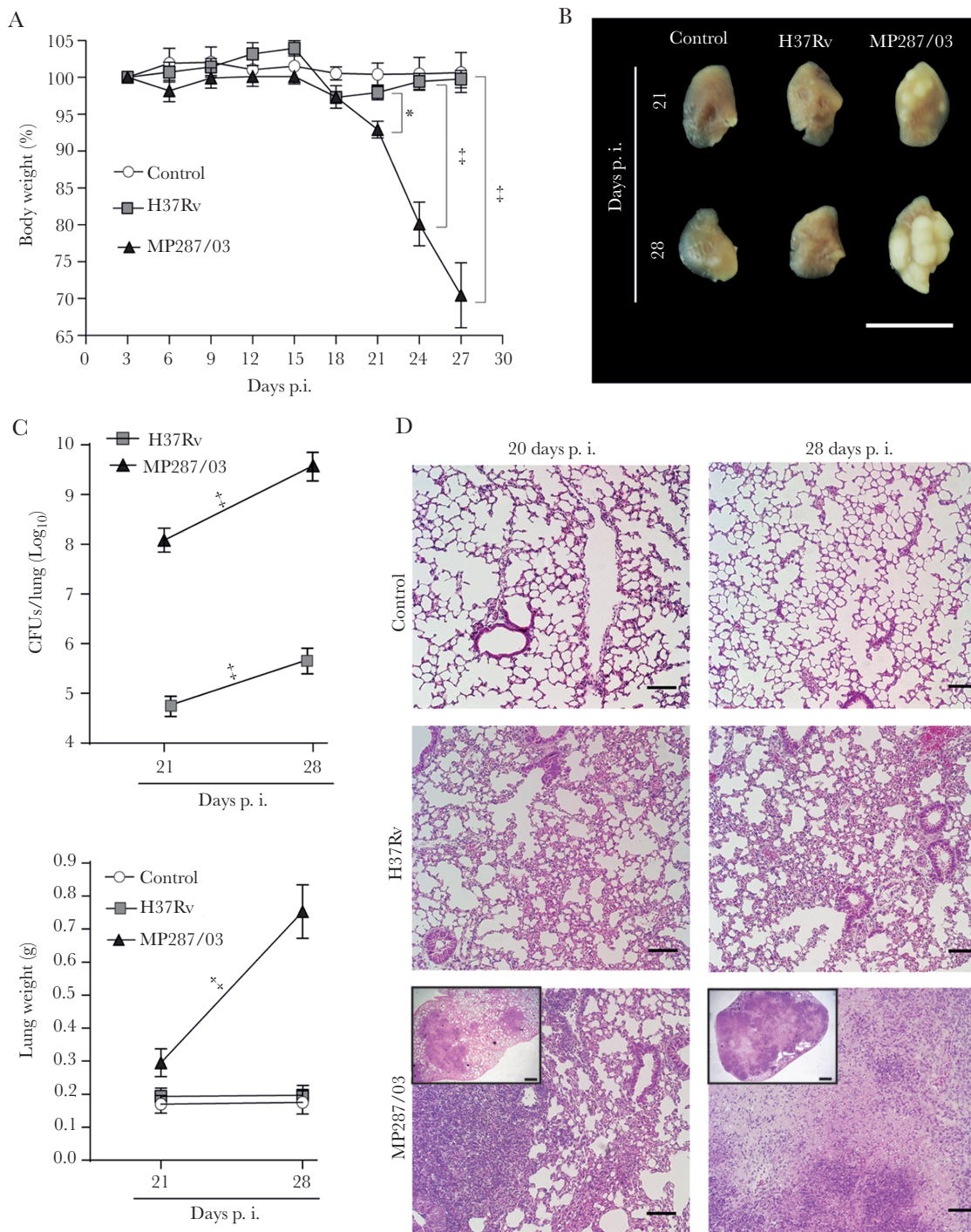


Figure 1. Pulmonary tuberculosis progresses rapidly in C57BL/6 mice infected with MP287/03 mycobacteria. C57BL/6 mice were infected intratracheally with approximately 100 H37Rv or MP287/03 bacilli, and noninfected mice were used as control. *A*, Percentages of body weights in relation to time 0 are shown. *B*, Lung macroscopic images (scale bars represent 1 cm). *C*, Colony-forming units (CFUs) per lung and lung weights. *D*, Representative lung sections stained with hematoxylin-eosin ($\times 100$ magnification; scale bars represent 100 μm in amplified images and 500 μm in inserts). Data represent 2 independent experiments with 3–5 mice each. * $P < .05$; † $P < .001$.

severe tuberculosis was accompanied by the late expression of the arginase 1 (*Arg1*) gene, a hallmark of MDSCs [32]. The expression of these genes and cytokines was low in lung cell preparations of H37Rv-infected mice. In addition, total CD4⁺ and

CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD4⁺ T-cell numbers per lung were reduced in MP287/03 infection and increased in H37Rv infection from day 21 to 28 after infection (Figure 4B and Supplementary Figure 2A and 2B).

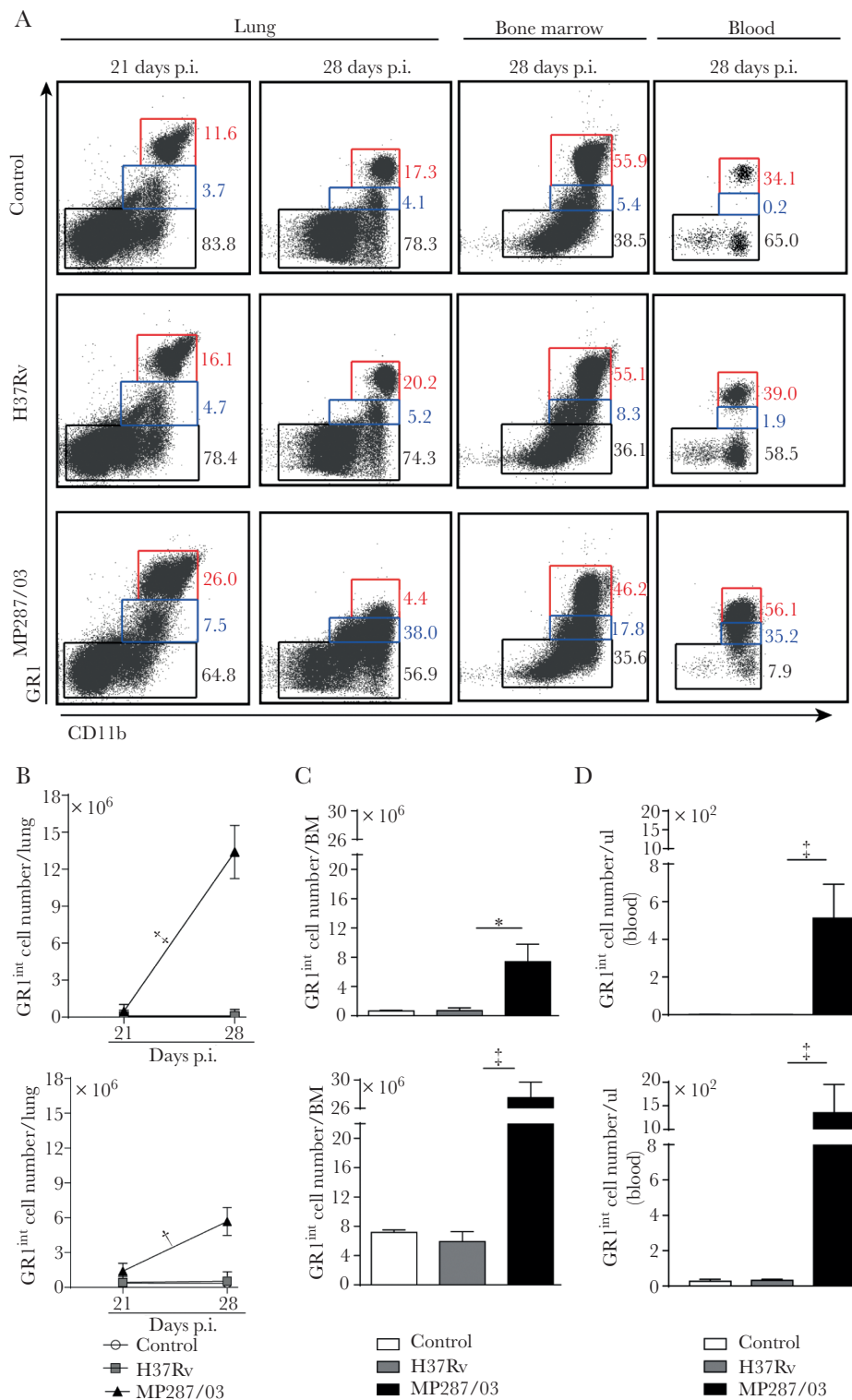


Figure 2. CD11b⁺GR1^{int} myeloid cells migrate into the lungs during severe tuberculosis. C57BL/6 mice were infected intratracheally with approximately 100 H37Rv or MP287/03 bacilli, and noninfected mice were used as control. *A*, Dot plots showing GR1 and CD11b expression in CD4⁺CD8⁻CD19⁻NK1.1⁻CD11c⁻CD45⁺ live cells from lungs, bone marrow (BM), and blood at 21 or 28 days after infection. *B–D*, GR1^{int} and GR1^{hi} cell counts in lungs, BM (2 femurs and 2 tibias, at 28 days after infection), and blood (at 28 days). Data represent 2 independent experiments with 3–5 mice each. **P* < .05; [†]*P* < .01; [‡]*P* < .001.

Similar results were obtained for CD8⁺ T cells (Supplementary Figure 2A, 2C, and 2D). CD69 expression in CD44⁺CD62L⁻ T cells is an indicative phenotype for cell activation and homing

to lung parenchyma [33]. Notably, the numbers of IFN- γ -producing CD44⁺CD62L⁻CD4⁺ and CD44⁺CD62L⁻CD8⁺ T cells were comparable on days 21 and 28 after infection with

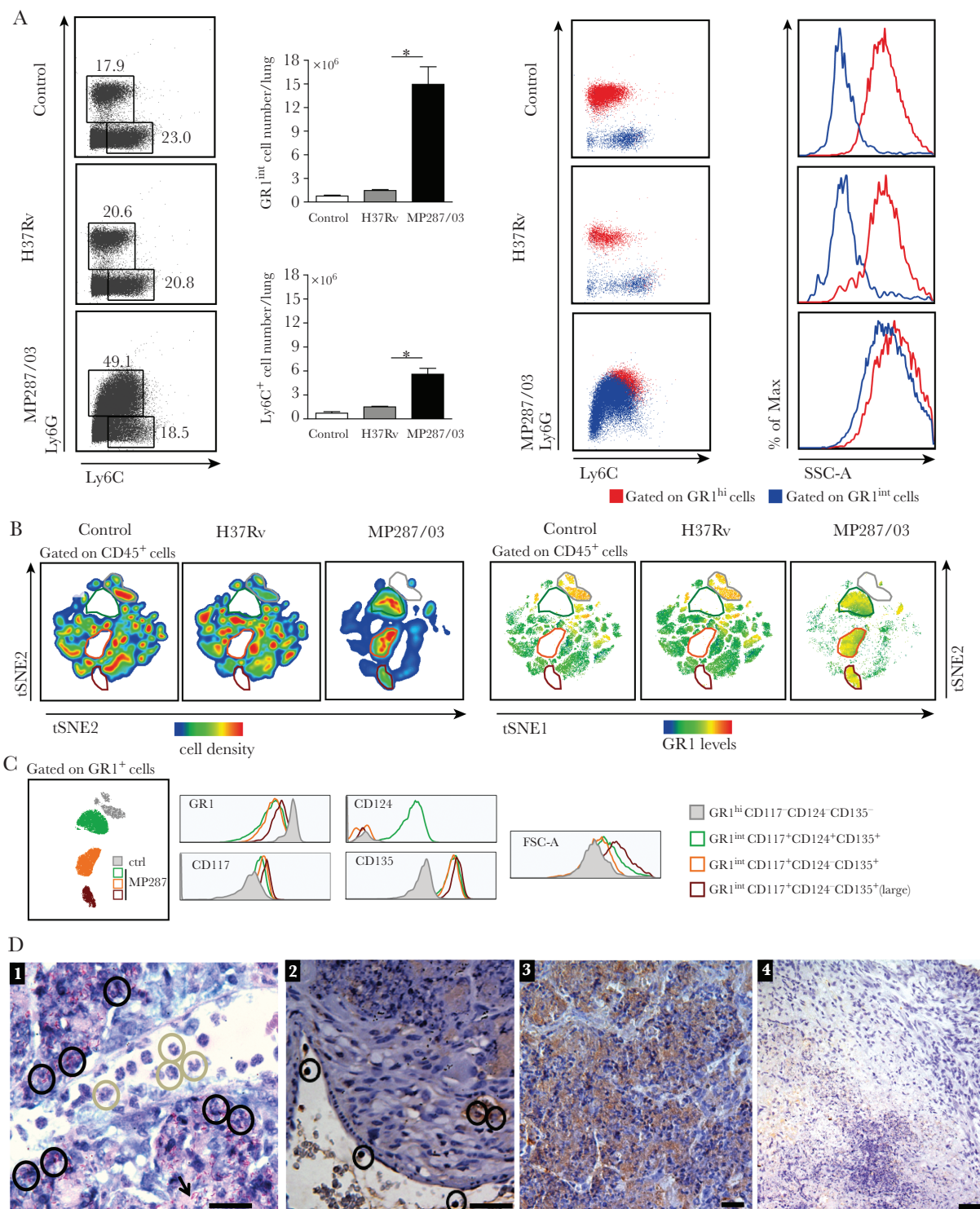


Figure 3. Immature granulocytic cells massively infiltrate the lungs during severe tuberculosis. *A–C*, Lung infiltrating cells were evaluated in C57BL/6 mice at day 28 after infection with approximately 100 H37Rv or MP287/03 bacilli. Noninfected mice were used as controls. *A*, *Left*, Dot plots showing Ly6G and Ly6C expression in CD4⁺CD8⁺CD19⁺NK1.1⁻CD11c⁻CD45⁺ live cells, and CD11b⁺Ly6G⁺ and CD11b⁺Ly6C⁺ cell counts per lung. *Right*, Dot plots show Ly6G and Ly6C expression in CD11b⁺GR1^{hi} and CD11b⁺GR1^{int} cells, and histograms display cell granularity. Abbreviation: SSC-A, side scatter area. *B*, The *t*-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) maps show CD45⁺ cell clusters of concatenated lung cells from controls and MP287/03-infected mice in relation to cell density and GR1 levels. Four CD11b⁺GR1⁺ cell clusters are outlined in different colors (gray, green, orange, brown). *C*, Histograms show GR1, CD117, CD124, and CD135 expression and forward scatter area (FSC-A) in the CD11b⁺GR1⁺ cell clusters. *D*, Lung histological analyses of mice at day 28 after infection with approximately 100 MP287/03 bacilli are shown (scale bars represent 20 μ m). *D1*, Granulocytes with unilobed or ring-shaped nucleus, consistent with the morphology of polymorphonuclear (PMN)-myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) (gray circles), recruited into the lungs and infected soon after transmigration across the vascular endothelium (black circles). Many necrotic cells releasing intracellular bacteria stained in red by the Ziehl-Neelsen method can be seen in lung tissue (black arrow). *D2*, Immunohistochemical image shows transmigration GR1⁺ cells (black circles). *D3*, Strong staining of intra-alveolar GR1⁺ cells can be seen in areas of alveolitis. Note intact and dying cells. *D4*, Weak staining for the GR1 marker was observed in necrotic area and surrounding tissue in a granulomatous lesion. Data represent 2 independent experiments with 3–5 mice each. **P* < .05.

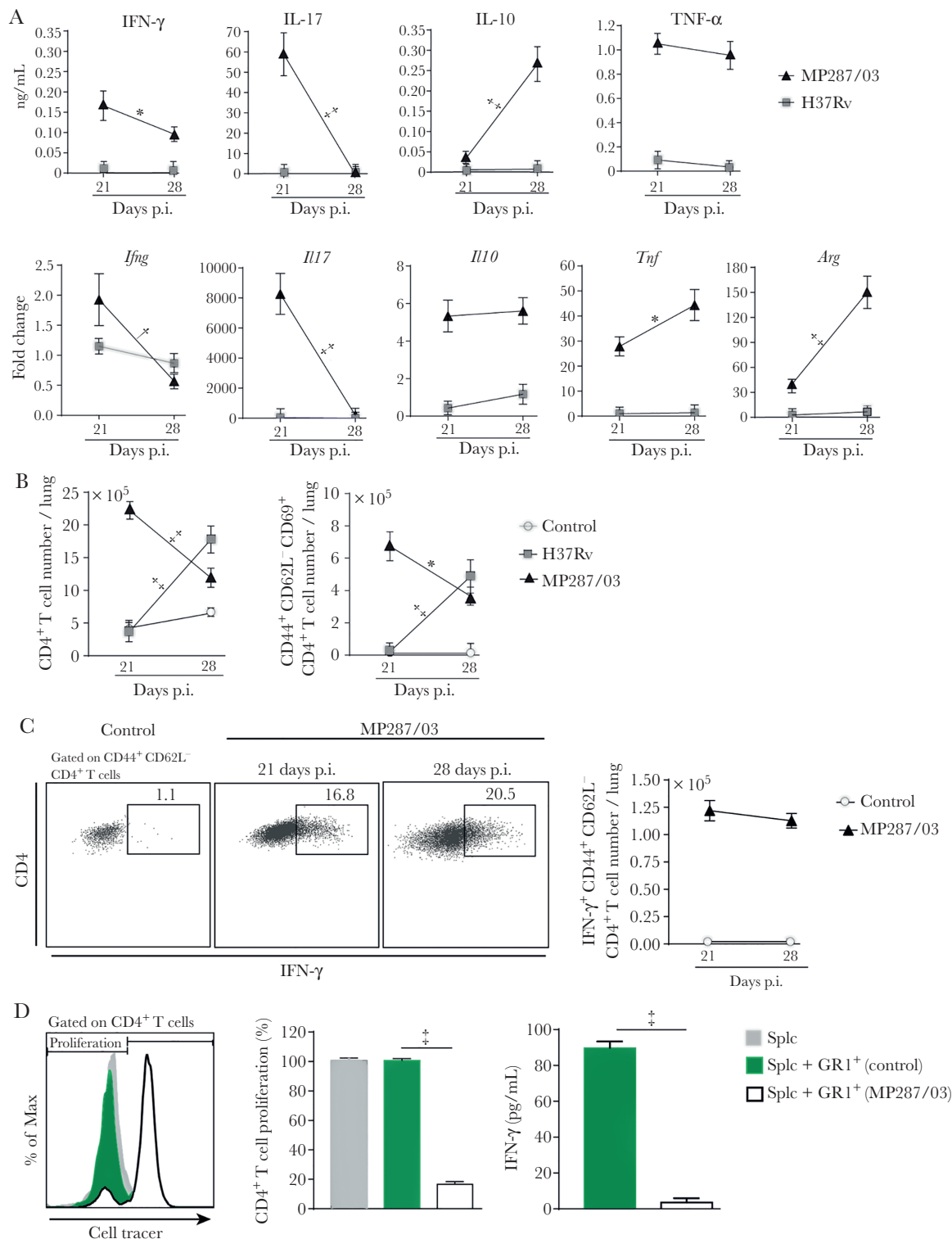


Figure 4. GR1⁺ cells suppress CD4⁺ T-cell responses. C57BL/6 mice were infected with approximately 100 H37Rv or MP287/03 bacilli, and noninfected mice were used as controls. **A**, Cytokine concentrations in 48-hour-culture supernatants of lung cells and the *Ifng*, *Il17a*, *Il10*, *Tnfa*, and *Arg1* gene expression (fold change) in lung cell preparations are shown. Abbreviations: IFN, interferon; IL-10 and IL-17, interleukin 10 and 17; TNF, tumor necrosis factor. **B**, Graphs showing CD4⁺ and CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD4⁺ T-cell counts per lung. **C**, Dot plots showing intracellular IFN- γ in CD44⁺CD62L⁻CD4⁺ T cells and IFN- γ ⁺CD44⁺CD62L⁻CD4⁺ T-cell counts per lung. **D**, Naive splenocytes were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies in the presence of GR1⁺ lung cells from mice at day 28 after infection with MP287/03 mycobacteria. GR1⁺ lung cells from noninfected mice were used as controls. Histograms show CD4⁺ T-cell proliferation, assessed by cell tracer dilution assay. Graphs show percentages of proliferating CD4⁺ T cells and IFN- γ concentrations in cell supernatants. Data represent 2 independent experiments with 3–5 mice each. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$.

MP287/03 mycobacteria, despite the increase in lung inflammatory response (Figure 4C and Supplementary Figure 3A). Furthermore, magnetically sorted GR1⁺ cells from lung and bone marrow cell preparations obtained at day 28 after infection with MP287/03 mycobacteria suppressed CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation and IFN- γ production (Figure 4D and Supplementary Figure 3B–3E). In contrast, lung and bone marrow GR1⁺ cells from noninfected controls had no suppressive effect on T-cell responses. Of note, GR1⁺ cell isolation performed for these experiments yielded >90% purity (Supplementary Figure 3F). These findings demonstrate that CD11b⁺GR1^{int} cells generated during severe tuberculosis efficiently suppress T-cell responses.

Depletion of GR1⁺ Cells in Mice With Severe Tuberculosis: Effects on Disease and T-Cell Suppression

To assess whether CD11b⁺GR1^{int} cells contribute to tuberculosis severity, MP287/03-infected mice were treated with anti-GR1 antibodies or IgG isotype control every 3 days starting 21 days after infection (Figure 5A). Anti-GR1 treatment significantly increased mouse survival but had no effect on body weight loss. Pneumonia and tissue damage were greatly reduced after anti-GR1 treatment as evidenced macroscopically by the decrease in lung white nodules, relative masses and weights (Figure 5B). Improved pathogen control was noted in the lower numbers of colony-forming units in the lungs and bone marrow of anti-GR1–treated mice (Figure 5B and Supplementary Figure 4A).

Lung histological analysis revealed a lower commitment of the aerated alveolar space after anti-GR1 therapy (Figure 5C). Mice treated with isotype control showed extensive areas of pneumonia with numerous foci of caseous necrosis (Figure 5D). Alveolitis with abundant intracellular bacteria and necrotic areas with many extracellular bacteria were observed throughout the lung tissue in isotype control–treated mice. In contrast, anti-GR1–treated mice developed medium-sized lung lesions composed of alveoli filled with homogeneous acellular liquid mass and numerous erythrocytes in the alveolar walls. Notably, the alveoli in these lesions contained large numbers of growing bacilli, forming cords and clumps. Alveolar macrophages with highly vacuolated cytoplasm and containing phagocytized erythrocytes were also observed in the preserved lung tissue.

Next, the effects of antibody therapy on GR1⁺ cells were assessed in MP287/03-infected mice. The leukocyte population in the lungs was reduced after anti-GR1 treatment (Figure 6A). Phenotypical analysis of lung myeloid cells showed a complete elimination of GR1^{int}, GR1^{hi} and Ly6G⁺ populations. Depletion of neutrophils in the blood ranged from 25 to 50%, and the monocyte population was reduced by almost 75% (Supplementary Figure 4B). Because the presence of CD11b⁺GR1^{int} cells in the lungs of MP287/03-infected mice was associated with T-cell

suppression in vitro and in vivo, we investigated whether the elimination of GR1⁺ cells benefited T-cell responses.

Anti-GR1 therapy increased CD4⁺ and CD8⁺ T-cell numbers per lung, but no effect was observed on CD44⁺CD62L[−]CD69⁺CD4⁺ and CD44⁺CD62L[−]CD69⁺CD8⁺ populations (Figure 6B and Supplementary Figure 4C). The numbers of IFN- γ –producing CD44⁺CD62L[−]CD4⁺ and CD44⁺CD62L[−]CD8⁺ T cells were also not affected by antibody therapy (Figure 6C and Supplementary Figure 4D). However, IFN- γ ⁺CD44⁺CD62L[−] T-cell percentages in lung infiltrates were nearly 80% higher in anti-GR1–treated mice (0.78% \pm 0.10%) than in isotype control–treated mice (0.44% \pm 0.05%). In addition, a 3-fold higher IFN- γ production was observed in lung leukocyte supernatants of anti-GR1–treated mice compared with isotype control–treated mice (Figure 6D).

Taken together, these results show that GR1⁺ cell depletion during severe tuberculosis caused by MP287/03 mycobacteria prevents the expansion and fusion of primary pulmonary lesions, as well as the development of intragranulomatous caseous necrosis (Figure 7). An increase in mouse survival and partial recovery of T-cell function were also observed in infected mice depleted of GR1⁺ cells. In addition, anti-GR1 therapy reduced lung bacterial load, but mycobacteria released from the depleted cells proliferated extracellularly in the pulmonary alveoli.

DISCUSSION

MDSCs have been recently detected in blood and lung compartments of children and adults with active pulmonary tuberculosis [34–37]. However, the role of these cells in tuberculosis pathogenesis, including possible positive or negative effects, is still under debate, and our findings may help clarify this issue. The accumulation of CD11b⁺GR1^{int} cells in the lungs during advanced MP287/03 infection, along with the development of extensive inflammatory and necrotic lesions, supports their involvement in disease progression. Three large CD11b⁺GR1^{int} subsets were identified based on immature myeloid cell markers and cell size. IL-4Ra expression characterized the largest subset, which also expressed the classic hematopoiesis-promoting cytokine receptors c-kit and Flt-3 [38, 39]. Positive regulation of IL-4Ra contributes to cell function and survival [40–42] and was observed in G-MDSC and M-MDSC subsets from tuberculosis-susceptible mice infected with H37Rv mycobacteria [11].

The other 2 subsets were positive only for c-kit and Flt-3, and their subdivision according to a small or large cell size may reflect different stages of the proliferative cycle. The presence of lung and bone marrow GR1⁺ cells in MP287/03-infected mice with immunosuppressive activity in vitro, together with T-cell suppression in vivo, allowed us to classify CD11b⁺GR1^{int} cells as MDSCs [13]. The predominance of G-MDSCs in the lungs of MP287/03-infected mice was demonstrated by Ly6G expression, high cell granularity, and morphology compatible with immature neutrophils. G-MDSCs likely migrated to the lungs via

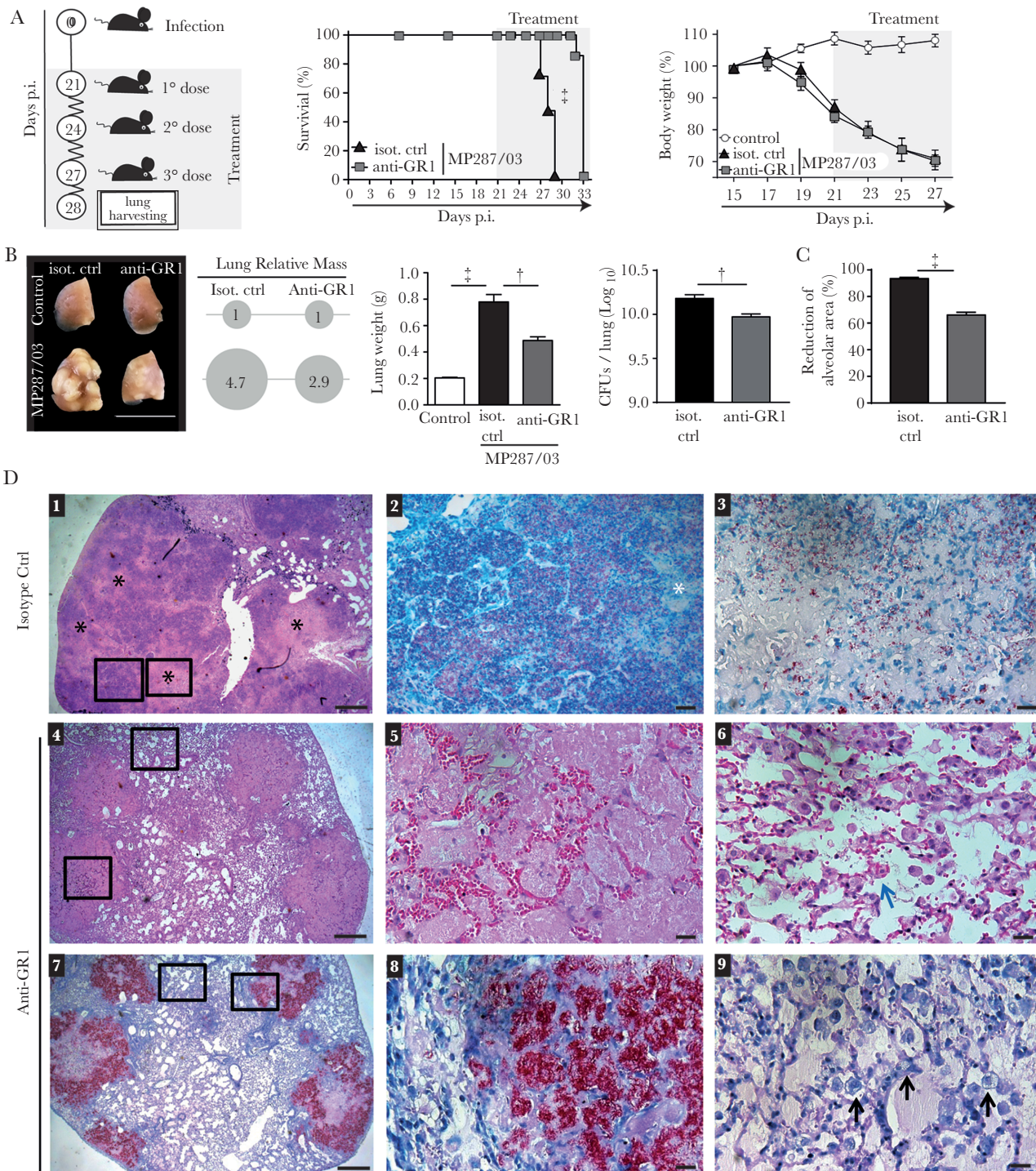


Figure 5. Anti-GR1 treatment reduces tuberculosis severity in MP287/03-infected mice. C57BL/6 mice were infected intratracheally with approximately 100 MP287/03 bacilli and treated with anti-GR1 monoclonal antibodies or isotype control. *A*, Schematic illustration of the experimental protocol for anti-GR1 therapy, survival curves, and percentages of body weights in relation to time 0. *B–D*, Mouse lungs were evaluated at day 28 of infection. *B*, *C*, Lung macroscopic images, relative masses (circles), lung weights, colony-forming units (CFUs) per lung and morphometric quantifications of the alveolar space are shown. *D*, Representative lung sections stained using hematoxylin-eosin (*D1*, *D4–D6*) or Ziehl-Neelsen (*D2*, *D3*, *D7–D9*) methods. Scale bars correspond to 20 μ m (*D2*, *D3*, *D5*, *D6*, *D8*, *D9*) or 500 μ m (*D1*, *D4*, *D7*). *D1*, Extensive areas of pneumonia with numerous foci of caseous necrosis (black stars). *D2*, Magnified area from *D1* (left square) showing alveolitis with numerous intracellular bacilli in the alveoli and extracellular bacilli in region of recent necrosis (white star). *D3*, Magnified area from *D1* (right square) showing low numbers of bacilli in region of central necrosis. *D4*, Medium-sized lesions surrounded by relatively preserved lung tissue. *D5*, Magnified lesion from *D4* (lower square) showing alveoli filled with homogeneous acellular liquid mass and numerous erythrocytes in alveolar walls. *D6*, Magnified area from *D4* (upper square) showing relatively preserved lung tissue with macrophages phagocytizing erythrocytes (blue arrow). *D7*, Alveoli filled with extracellular bacilli in medium-sized lesions. *D8*, Magnified area from *D7* (right square) showing numerous extracellular growing bacilli, forming cords and clumps. *D9*, Magnified area from *D7* (left square) showing numerous alveolar macrophages with highly vacuolated cytoplasm (black arrows). Data represent 2 independent experiments with 3–5 mice each. $^{\dagger}P < .01$; $^{\dagger\dagger}P < .001$.

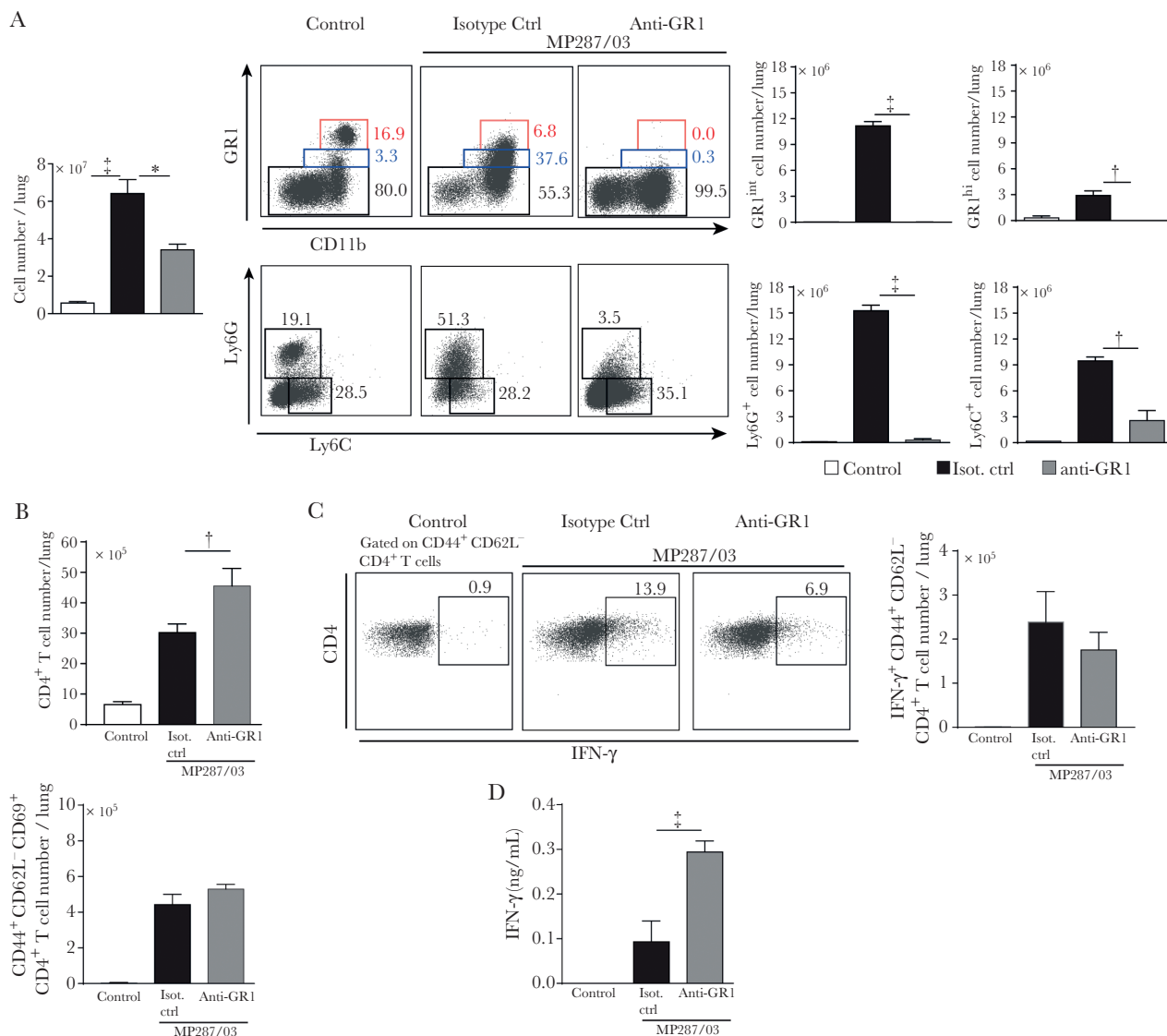


Figure 6. Anti-GR1 treatment efficiently depletes GR1⁺ cells and attenuates CD4⁺ T-cell suppression during severe tuberculosis. C57BL/6 mice were infected intratracheally with approximately 100 MP287/03 bacilli and treated with anti-GR1 monoclonal antibodies or isotype control. *A, Left*, Cell counts per lung. Dot plots show GR1, CD11b, Ly6G, and Ly6C expression in CD4⁺CD8⁻CD19⁻NK1.1⁻CD11c⁻CD45⁺ live cells. *Right*, GR1^{int}, GR1^{hi}, Ly6G⁺, and Ly6C⁺ cell numbers per lung. *B*, Total CD4⁺ and CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD4⁺ T-cell counts per lung. *C*, Dot plots of intracellular interferon (IFN) γ in CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD4⁺ T cells. The IFN- γ ⁺CD44⁺CD62L⁻CD69⁺CD4⁺ T-cell counts per lung are shown. *D*, IFN- γ concentrations in 48-hour culture supernatants of lung cells. Data represent 2 independent experiments with 3–5 mice each. * $P < .05$; [†] $P < .01$; [‡] $P < .001$.

the bloodstream with the worsening of the disease, as seen in cancer patients [31, 43]. These cells were infected by MP287/03 mycobacteria right after crossing the vascular endothelium and located preferentially in the alveoli.

Emergency hematopoiesis supplies the high demand for myeloid cells in response to excessive or chronic infections, and it plays a beneficial role for the host by helping to restrict the proliferation of pathogens and assisting tissue repair [44]. However, MDSCs may harbor intracellular microbial multiplication and suppress the immune response at the infection site due to their regulatory profile, which worsens disease outcomes. The first signal for the generation of MDSCs is a

sustained production of factors that stimulate myelopoiesis [45, 46]. A second signal is required for the acquisition of immunosuppressive activity [46]. In the case of severe tuberculosis, mycobacterial recognition by the Toll-like receptor 2–NF- κ B pathway and damage-associated molecules such as heat shock proteins and adenosine may provide the second signal [45, 47, 48]. MP287/03 bacilli were found not only in the lungs, but also in the bone marrow, providing the second signal for MDSCs locally. In milder infections, local and circulating cells are sufficient to contain the infection, and emergency hematopoiesis is not induced [44]. This view may explain why a low-dose infection with MP287/03 bacilli

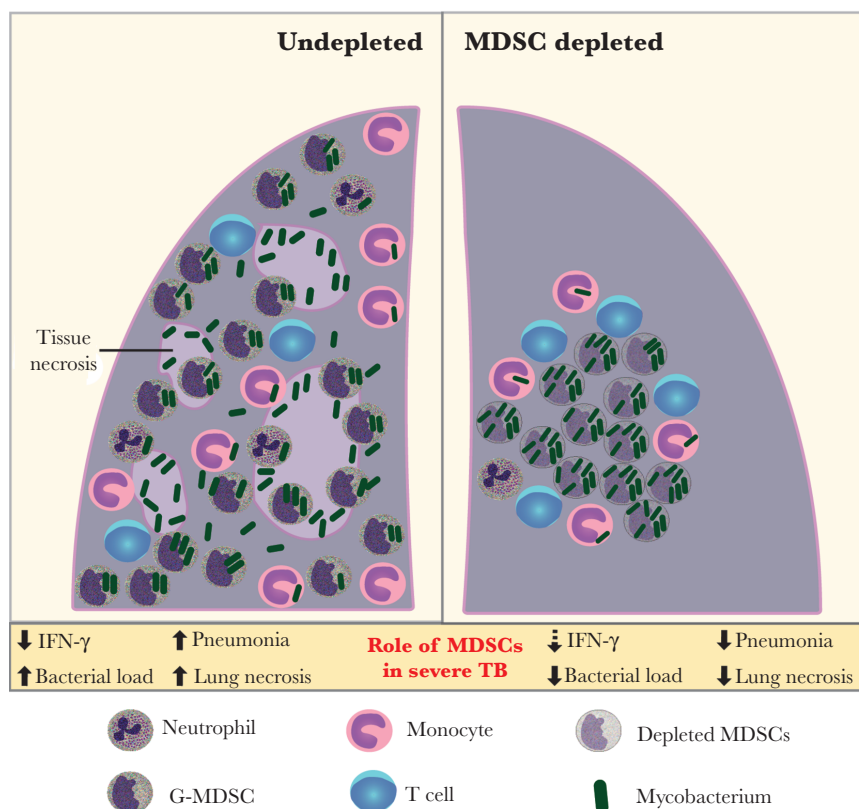


Figure 7. Schematic illustration showing the role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in severe tuberculosis caused by hypervirulent mycobacteria. In the advanced stage of tuberculosis caused by highly virulent mycobacteria, G-MDSCs produced in the bone marrow are massively recruited into the lungs. These cells are infected shortly after crossing the vascular endothelium and suppress T-cell proliferation and interferon (IFN) γ production. Located preferentially in the alveoli, G-MDSCs promote mycobacterial growth and the development of inflammatory and necrotic pulmonary lesions. Depletion of GR1⁺ cells results in marked improvement of pulmonary tuberculosis and increased mouse survival, along with partial recovery of T-cell function. Lung bacterial load is reduced in the absence of these cells, but mycobacteria released from the depleted cells proliferated extracellularly inside the alveoli. This scenario supports the use of therapies targeting MDSCs to improve the outcome of severe tuberculosis associated with uncontrolled pulmonary inflammation.

induced robust G-MDSC recruitment into the lungs, but the same did not occur with H37RV bacilli.

In this model of severe tuberculosis, G-MDSCs infiltrated the lungs during acute infection. In previous studies of our group and others using the slowly progressive H37Rv strain or moderately virulent M299 Beijing strain, the presence of G-MDSCs in the lungs was observed in the late chronic infection, coinciding with an increased inflammatory response [10, 49]. These findings support the concept that MDSC recruitment is associated with disease severity, and not with a particular mycobacterial strain. Accordingly, GR1 expression inversely correlated with weight loss in tuberculosis-susceptible mice infected with H37Rv mycobacteria [10]. Furthermore, P2X7-deficient mice that are resistant to MP287/03 infection showed moderate infiltrates of mononuclear leukocytes, but not MDSCs, when infected with this hypervirulent mycobacteria [27, 28].

In addition, our study and others corroborate the view that immature myeloid cells acquire immunosuppressive activity

when tuberculosis becomes severe [10, 11]. Ly6G^{hi} and Ly6G^{int} cells from the lungs of tuberculosis-resistant C57BL/6 mice infected with H37Rv bacilli did not suppress T-cell function in vitro, but both cell populations showed immunosuppressive activity in tuberculosis-susceptible 129SvPas mice [50]. MDSCs isolated from the bone marrow of tuberculosis-susceptible I/St mice also suppressed T cells [10]. Although the intense migration of MDSCs to the lungs during acute infection seems to be harmful to the host, the presence of a limited MDSC population during the chronic disease can control inflammatory responses and prolong host survival, as previously suggested [49].

The effects of anti-GR1 therapy administered when the disease worsened and MDSCs infiltrated the lungs allow us to understand important aspects regarding the role of these cells in the pathogenesis of severe tuberculosis. The most striking observation in anti-GR1-treated mice was the presence of a large number of extracellular bacteria proliferating inside the pulmonary alveoli in medium-sized lesions, while the adjacent tissues

were relatively preserved and apparently free of bacilli. This scenario contrasts with the extensive inflammatory and necrotic lesions with many intracellular and extracellular bacilli observed in isotype control-treated mice and suggests that GR1⁺ cells, mainly G-MDSCs in our experimental conditions, act as a permissive niche for intracellular mycobacterial growth [50] and spread the bacilli throughout the lung tissue. Furthermore, the massive death of infected G-MDSCs is apparently decisive for the development of pulmonary necrotic lesions in MP287/03 infection.

Although the immunosuppressive activity of G-MDSCs may contribute to increase the pulmonary bacterial load in MP287/03-infected mice, GR1⁺ cell depletion promoted a limited recovery in T-cell function, which does not seem to be the main reason for the marked improvement of the disease. Mycobacteria released from depleted cells proliferated extracellularly in the alveoli apparently free of immunological control. The increase in IFN- γ production *ex vivo*, but not in the number of IFN- γ ⁺ T cells per lung *in vivo*, can be explained by the higher percentage of this population among infiltrating leukocytes as a result of GR1⁺ cell depletion. A reduction in T-cell exhaustion leading to enhanced IFN- γ secretion is another feasible explanation. The efficacy of MDSC depletion in improving pulmonary tuberculosis already in its advanced stage expands the spectrum of possibilities for MDSC-targeted therapies [19, 20].

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases online*. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Acknowledgments. We are grateful to José Soares Ferreira Neto for providing the MP287/03 *Mycobacterium bovis* strain. We also thank Maria Áurea de Alvarenga, Silvana Silva, and José Israel Lima for technical assistance.

Author contributions. C. C. B. B., E. P. A., and M. R. D. L. conceived and designed the experiments. C. C. B. B., I. S. C., G. A. S., E. M. S., A. H. R. d. N., F. M. A., T. L. B. V. S., and A. L. R. performed the experiments. C. C. B. B., G. A. S., E. M. S., and M. R. D. L. analyzed the data. C. C. B. B., M. H. H., R. A. F., J. M. A., E. B. L., and M. R. D. L. contributed reagents, materials, or analysis tools.

Financial support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Paulo (FAPESP-Brazil; grants 2015/20432-8 to M. R. D. L. and 2014/22986-8 and 2014/22986-8 and 2017/09110-4 to C. C. B. B.) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil; grants 408909/2018-8 and 303810/2018-1 to M. R. D. L.).

Potential conflicts of interest: All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2019.
- Khan MK, Islam MN, Ferdous J, Alam MM. An overview on epidemiology of tuberculosis. *Mymensingh Med J* 2019; 28:259–66.
- Scriba TJ, Penn-Nicholson A, Shankar S, et al; other members of the ACS cohort study team. Sequential inflammatory processes define human progression from *M. tuberculosis* infection to tuberculosis disease. *PLoS Pathog* 2017; 13:a018499.
- Pagan AJ, Ramakrishnan L. Immunity and immunopathology in the tuberculous granuloma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 5:e1006687.
- Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001; 345:1098–104.
- Bell LCK, Noursadeghi M. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16:80–90.
- Goletti D, Petrone L, Ippolito G, Niccoli L, Nannini C, Cantini F. Preventive therapy for tuberculosis in rheumatological patients undergoing therapy with biological drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2018; 16: 501–12.
- Caws M, Thwaites G, Dunstan S, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000034.
- Tram TTB, Nhung HN, Vijay S, et al. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates is associated with sputum pre-treatment bacterial load, lineage, survival in macrophages, and cytokine response. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8:417.
- Tsiganov EN, Verbina EM, Radaeva TV, et al. Gr-1^{dim}CD11b⁺ immature myeloid-derived suppressor cells but not neutrophils are markers of lethal tuberculosis infection in mice. *J Immunol* 2014; 7:7.
- Knaul JK, Jörg S, Oberbeck-Mueller D, et al. Lung-residing myeloid-derived suppressors display dual functionality in murine pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190:1053–66.
- Obregon-Henao A, Henao-Tamayo M, Orme IM, Ordway DJ. Gr1^{int}CD11b⁺ myeloid-derived suppressor cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One* 2013; 8:e80669.

13. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* **2018**; 19: 108–19.
14. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* **2007**; 67:425–6.
15. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **2008**; 181:5791–802.
16. Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* **2016**; 7:12150.
17. Goldmann O, Beineke A, Medina E. Identification of a novel subset of myeloid-derived suppressor cells during chronic staphylococcal infection that resembles immature eosinophils. *J Infect Dis* **2017**; 216:1444–51.
18. Principi E, Raffaghello L. The role of the P2X7 receptor in myeloid-derived suppressor cells and immunosuppression. *Curr Opin Pharmacol* **2019**; 47:82–9.
19. Young C, Walzl G, Du Plessis N. Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis. *Mucosal Immunol* **2020**; 13:190–204.
20. du Plessis N, Kotze LA, Leukes V, Walzl G. translational potential of therapeutics targeting regulatory myeloid cells in tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol* **2018**; 8:332.
21. Orme IM, Robinson RT, Cooper AM. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat Immunol* **2015**; 16:57–63.
22. Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, et al. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* **2010**; 207:1453–64.
23. Poe SL, Arora M, Oriss TB, et al. STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. *Mucosal Immunol* **2013**; 6:189–99.
24. Medina-Echeverz J, Haile LA, Zhao F, et al. IFN- γ regulates survival and function of tumor-induced CD11b⁺ Gr-1^{high} myeloid derived suppressor cells by modulating the anti-apoptotic molecule Bcl2a1. *Eur J Immunol* **2014**; 44:2457–67.
25. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression. *Vaccines* **2016**; 4:36.
26. Amaral EP, Machado de Salles É, Barbosa Bomfim CC, et al. Inhibiting adenosine receptor signaling promotes accumulation of effector CD4⁺ T cells in the lung parenchyma during severe tuberculosis. *J Infect Dis* **2019**; 219: 964–74.
27. Amaral EP, Ribeiro SC, Lanes VR, et al. Pulmonary infection with hypervirulent mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathog* **2014**; 10:e1004188.
28. Bomfim CCB, Amaral EP, Cassado ADA, et al. P2X7 receptor in bone marrow-derived cells aggravates tuberculosis caused by hypervirulent *Mycobacterium bovis*. *Front Immunol* **2017**; 8:435.
29. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* **1993**; 151:2399–408.
30. Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN, et al. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* **1991**; 147:22–8.
31. Hoffmann SHL, Reck DI, Maurer A, et al. Visualization and quantification of in vivo homing kinetics of myeloid-derived suppressor cells in primary and metastatic cancer. *Theranostics* **2019**; 9:5869–85.
32. Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol* **2012**; 91:167–81.
33. Bankovich AJ, Shiow LR, Cyster JG. CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4. *J Biol Chem* **2010**; 285:22328–37.
34. El Daker S, Sacchi A, Tempestilli M, et al. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expansion during active pulmonary tuberculosis is associated with high nitric oxide plasma level. *PLoS One* **2015**; 10:e0123772.
35. du Plessis N, Loebenberg L, Kriel M, et al. Increased frequency of myeloid-derived suppressor cells during active tuberculosis and after recent *Mycobacterium tuberculosis* infection suppresses T-cell function. *Am J Respir Crit Care Med* **2013**; 188:724–32.
36. Du Plessis N, Jacobs R, Gutschmidt A, et al. Phenotypically resembling myeloid derived suppressor cells are increased in children with HIV and exposed/infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* **2017**; 47:107–18.
37. Yang B, Wang X, Jiang J, Zhai F, Cheng X. Identification of CD244-expressing myeloid-derived suppressor cells in patients with active tuberculosis. *Immunol Lett* **2014**; 158:66–72.
38. Kao J, Ko EC, Eisenstein S, Sikora AG, Fu S, Chen SH. Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol* **2011**; 77:12–9.
39. Kazi JU, Rönstrand L. FMS-like tyrosine kinase 3/FLT3: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* **2019**; 99:1433–66.
40. Roth F, De La Fuente AC, Vella JL, Zoso A, Inverardi L, Serafini P. Aptamer-mediated blockade of IL4Ra triggers

- apoptosis of MDSCs and limits tumor progression. *Cancer Res* **2012**; 72:1373–83.
41. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, et al. IL4R α ⁺ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* **2009**; 182:6562–8.
 42. Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, et al. GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor- α . *Cancer Res* **2013**; 73:6413–23.
 43. Dubinski D, Wölfer J, Hasselblatt M, et al. CD4⁺ T effector memory cell dysfunction is associated with the accumulation of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in glioblastoma patients. *Neuro Oncol* **2016**; 18:807–18.
 44. Boettcher S, Manz MG. Regulation of inflammation- and infection-driven hematopoiesis. *Trends Immunol* **2017**; 38:345–57.
 45. Millrud CR, Bergenfelz C, Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* **2017**; 8:3649–65.
 46. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* **2015**; 98:913–22.
 47. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* **2010**; 120:457–71.
 48. Ryzhov S, Novitskiy SV, Goldstein AE, et al. Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b⁺Gr1⁺ cells. *J Immunol* **2011**; 187:6120–9.
 49. Almeida FM, Ventura TL, Amaral EP, et al. Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. *PLoS One* **2017**; 12:e0173715.
 50. Lovewell RR, Baer CE, Mishra BB, Smith CM, Sasseti CM. Granulocytes act as a niche for *Mycobacterium tuberculosis* growth. *Mucosal Immunol* **2020**. doi: [10.1038/s41385-020-0300-z](https://doi.org/10.1038/s41385-020-0300-z).