

IGOR SANTIAGO DE CARVALHO

**Estudo do receptor P2RX7 no estabelecimento de
células T CD4⁺ residentes no pulmão em resposta a
infecções locais**

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

São Paulo
2022

IGOR SANTIAGO DE CARVALHO

**Estudo do receptor P2RX7 no estabelecimento de
células T CD4⁺ residentes no pulmão em resposta a
infecções locais**

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

Área de concentração: Imunologia

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

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Elena Lassounskaia

Versão original

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)

Santiago de Carvalho, Igor

Estudo do receptor P2RX7 no estabelecimento de células T CD4+ residentes no pulmão em resposta a infecções locais / Igor Santiago de Carvalho; orientadora Maria Regina D'Império Lima; coorientadora Elena Lassounskaia. -- São Paulo, 2022.

156 p.

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

1. Células T CD4. 2. Dano pulmonar. 3. Infecção pulmonar. 4. P2RX7. I. D'Império Lima, Maria Regina, orientador. II. Lassounskaia, Elena, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Igor Santiago de Carvalho

Título da Dissertação/Tese: Estudo do receptor P2RX7 no estabelecimento de células T CD4⁺ residentes no pulmão em resposta a infecções locais

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 "Avaliação do papel do receptor P2X7 na geração de diferentes subtipos de linfócitos T CD4+ na tuberculose pulmonar grave", protocolada sob o CEUA nº 5611150818, sob a responsabilidade de **Maria Regina D'Imperio Lima e equipe; Igor Santiago de Carvalho** - 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 21/09/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the role of the P2X7 receptor in the generation of different subtypes of CD4+ T lymphocytes in severe pulmonary tuberculosis", utilizing 256 Isogenics mice (256 males), 784 Genetically modified mice (GMO) (784 males), protocol number CEUA 5611150818, under the responsibility of **Maria Regina D'Imperio Lima and team; Igor Santiago de Carvalho** - 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 09/21/2018.

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

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas
Linhagem:	C57BL/6		N amostral: 256
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas
Linhagem:	P2X7 KO		N amostral: 256
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas
Linhagem:	CD4-/-		N amostral: 256
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas
Linhagem:	P2X7flox/flox		N amostral: 6
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas
Linhagem:	CD4Cre		N amostral: 10
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 8 semanas
Linhagem:	CD4CreP2X7flox/flox		N amostral: 256

Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III / Cidade Universitária, Butantã - CEP 05508-000 - São Paulo/SP - tel: 55 (11) 3091-7733
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 16h : e-mail: cep@icb.usp.br
CEUA N 5611150818



Prof. 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-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



IACUC HazID AO

Date: Thursday, February 10, 2022 10:19:00 AM

IACUC Protocol General Information A00005542-20

Title of Project:

Role of extracellular nucleotides in CD8+ T cell immune responses to viral infection, cancer and asthma

Intention:

Experimental Research

Species:

Mice

Indicate Mayo Foundation location(s) where the protocol will be conducted:

Arizona

Principal Investigator:

Henrique Borges da Silva

Housing

Check all facilities where the animals will be housed:

Building

Samuel C. Johnson Res. Bldg.

Will live animals be taken out of the animal facility to laboratory or non-clinical areas for housing longer than 24 hours (over 24 hours is considered **Satellite housing**)? [Satellite Housing Policy](#)

Yes No

Will live animals be taken out of the animal facility for any procedures? (Surgery, euthanasia, blood draws, injections, etc.)

Yes No

Will procedures involving animals be performed in clinical areas supporting patients? Yes No

Will this study be conducted in accordance with [21CFR part 58](#), Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies? Please note these are usually pre-clinical studies and additional institutional approvals will be required before this protocol can be activated. Yes No



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

Esta tese é dedicada aos meus pais, Derci e Elymar, aos meus irmãos, sobrinhos e a todos os cientistas brasileiros.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado sabedoria e fé para alcançar todos os meus objetivos até aqui. *“The Lord is gracious and righteous; our God is full of compassion. The Lord protects the simple hearted; when I was brought low, he saved me.”* (Psalm 116:8-9).

Aos meus pais Derci e Elymar por terem me dado todo suporte que precisei para chegar até aqui. Obrigado por terem acreditado nos meus sonhos e pela paciência que tiveram durante todos esses anos. Tudo isso sempre foi por vocês. Eu amo vocês!

Aos meus irmãos e sobrinhos que sempre se mostraram orgulhosos e me apoiaram nessa jornada acadêmica.

À minhas melhores amigas Bárbara, Nina e Thainá, que sempre foram o colo que precisei nos momentos mais difíceis desses anos de doutorado. Vocês são os melhores presentes que a vida já me deu. Amo muito vocês!

Aos meus amigos da nossa Eterna República Albert Einstein (Helvis, Marcus, Anderson, Renan, Ana Flávia, Rafael e Pedro) que viram esse sonho do doutorado na USP nascer e acompanharam todas as fases. Agora não seria diferente, vocês fazem parte disso. Obrigado por terem se alegrado e comemorado em todas as minhas conquistas.

Aos amigos que fiz morando no Altos do Butantã, Ewerton, Loreana, Paulo Evangelista, Paulo Newton e Guilherme, muito obrigado por me aguentar em todos os momentos finais. Principalmente enquanto eu escrevia e sofria por esta tese.

A um amigo muito especial que apareceu no momento que mais precisava e me ajudou a olhar para a vida de forma mais leve. Rodrigo, vou levar nossa amizade para sempre. Também quero agradecer aos amigos Flávia e João que estiveram comigo mesmo que de longe e foram cruciais na minha vida.

Às melhores pessoas que pude conhecer e me tornar amigo durante meu estágio no exterior. Carla e Suany, se eu fosse escrever o quão grato por ter vocês na minha vida eu precisaria de mais páginas. Todas as histórias que construímos juntos estarão para sempre guardadas no meu coração. Em breve continuaremos trilhar novos caminhos juntos no Arizona.

Às pessoas que me inspiraram na vida acadêmica, me deram suporte e as vezes acreditaram em mim mais do que eu mesmo. Francis, Prof^a. Fernanda, Prof^a. Márcia e Prof. Victor, sou muito grato pelo carinho que sempre tiveram por mim.

Aos amigos do Laboratório de Interações Neuroimunes, Prof. Jean Pierre, Carol, Nagela, Lilian, Yan, Laura, Tiago, Jonathan e Sandra meu agradecimento pelas conversas, cafés, churrascos e PMLs que tivemos. Esses momentos ficarão sempre marcados nas memórias mais felizes do doutorado.

Às pessoas que foram cruciais para esta tese. Dr^a. Gislane e Dr. Caio, vocês foram mais que colaboradores e coautores deste trabalho, vocês foram os melhores amigos que alguém pode ter no trabalho. Dedico esta tese também a vocês, muito obrigado!

Ao meu amigo e colaborador Dr. Fabrício que foi a primeira pessoa que acreditou em mim e me ensinou a ser um cientista quando eu ainda era apenas um calouro na UENF. Jamais esquecerei o dia que te perguntei (no pátio do CBB) se você achava que eu poderia estudar na USP e você disse que sim e me incentivou a me inscrever. Esta tese também é para você. Obrigado!

À minhas orientadoras Prof^a. Dr^a. Maria Regina e Prof^a. Dr^a Elena Lassounskaia, por terem MUITA paciência e por ter me ensinado a ser um bom cientista. Vocês foram mais que orientadoras, se tornaram as minhas maiores inspirações como cientista. Obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Prof. Dr. Jose Maria Alvarez Mosig, Dr^a. Érika, Paulo, Dr. Rafael, Dr^a. Maria, Dr^a. Gislane, Dr.

Caio, Msc. Deborah, Msc. Bruna, Msc. Rogério, Msc. Joauim Paulo, Luciana, Marcos e Danilo meu muito obrigado pela parceria durante esses anos.

Aos técnicos Rogério, Silvana e Aurea, pelo suporte científico e pelos cafezinhos que tomamos juntos nos intervalos.

Ao Prof. Dr. Henrique Borges da Silva, que me recebeu em seu laboratório na Mayo Clinic (Scottsdale, Arizona) e foi mais do que um chefe, agindo como um pai. Minha gratidão por cada conversa, orientação e caronas (haha). Obrigado!

Aos colegas de laboratório que fiz na Mayo Clinic, Prof^a. Dr^a. Jessica Lancaster, Dr^a. Trupti, Msc. Bruna, Tina, Harish, Akash, Sarah e Maggie, pela parceria nos 6 meses que estive lá.

Ao programa de Pós-graduação em Imunologia (ICB/USP e principalmente ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara e a Secretária Maria Eni pela disposição em ajudar em vários momentos.

Por fim, mas não menos importante, a mim que não desisti e consegui chegar até aqui!

MUITO OBRIGADO!!!

Estudo realizado no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, sob orientação e coorientação das professoras Dr^a. Maria Regina D'Império Lima e Dr^a Elena Lassounskaia, respectivamente e no Laboratório Nível 3 de Biossegurança, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do Prof. Dr. Mário Hirouyki Hirata. Este projeto recebeu auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) projetos números 2019/24700-8 e 2015/20432-8, do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Acredite em si próprio e chegará
um dia em que os outros não
terão outra escolha senão
acreditar com você.

– Cynthia Kersey

RESUMO

As células T CD4⁺ participam da resposta imune de várias doenças pulmonares. Em doenças infecciosas que afetam os pulmões, a resposta destas células pode gerar proteção ou agravamento. Na tuberculose causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a resposta de células T CD4⁺ é regulada pelo próprio tecido pulmão, que controla a entrada excessiva destas células no parênquima pulmonar. Este é um mecanismo que evita danos aos órgãos que possuem baixa capacidade regenerativa. Contudo, algumas doenças graves podem induzir a entrada desregulada de células T, como em infecções por cepas micobacterianas hipervirulentas e pelo vírus Influenza. Neste contexto, ainda não se sabe o que regula a entrada destas células no tecido pulmonar durante estas infecções e suas consequências. Portanto, este estudo buscou compreender o papel das células T CD4⁺ residentes na geração de dano pulmonar e agravamento de infecções pulmonares e os mecanismos envolvidos nesse processo. Para isso, utilizamos modelos de infecções pulmonares graves induzidas por *Mycobacterium bovis* (MP287) e vírus Influenza (PR8). A infecção com a cepa MP287 induz lesão pulmonar grave que está associada a altos números de células T CD4⁺ residentes em camundongos C57BL/6 (WT). A depleção de células T CD4⁺ 21 dias p.i. preveniu o agravamento da infecção. Em seguida, transferimos números intermediários (1×10^6) e altos (3×10^6) de células T CD4⁺ para camundongos *Cd4*^{-/-} infectados. Como resultado, apenas os camundongos que receberam altos números de células T CD4⁺ desenvolveram tuberculose grave. A tuberculose grave induz a liberação de altos níveis de ATP extracelular (eATP) que é reconhecido pelo receptor purinérgico P2RX7. A interação eATP-P2RX7 é crucial para geração de células T residentes. Adicionalmente, o P2RX7 é altamente expresso em células T CD4⁺ residentes no pulmão durante a infecção por MP287. Por isso, avaliamos se a expressão de P2RX7 pode regular a residência de células T CD4⁺ durante a infecção por MP287. Camundongos *P2rx7*^{-/-} e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* foram infectados e desenvolveram tuberculose branda associada a baixos números de células T CD4⁺ residentes no pulmão. Após a co-transferência de células T CD4⁺ isoladas de camundongos WT e *P2rx7*^{-/-} para camundongos *Cd4*^{-/-} encontramos majoritariamente células T CD4⁺ WT no parênquima pulmonar, enquanto as células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} foram localizadas principalmente na vasculatura. Para avaliar se esse fenômeno é infecção específico ou não, utilizamos o modelo de infecção viral com a cepa PR8. A deficiência de P2RX7 em células T preveniu a inflamação grave e formação de fibrose no pulmão durante a infecção por PR8. Além disso, as células T CD4⁺ residentes estão reduzidas nos camundongos deficientes de P2RX7. Para entender quais as vias moleculares envolvidas neste fenômeno, as células T CD4⁺ residentes foram isoladas do pulmão 7 dias p.i. com PR8 para execução de um RNAseq. Os dados gerados demonstram que as células T CD4⁺ residentes deficientes em P2RX7 têm expressão reduzida de genes relacionados à migração e proliferação celular como: *Cxcr3* e *Mki67*. Estes dados indicam que a interação eATP-P2RX7 no pulmão durante infecções induz o acúmulo de células T CD4⁺ no tecido, aumentando a migração e proliferação destas células. Para entender qual é a fonte de eATP no tecido que as células T CD4⁺ utilizam durante a infecção por PR8, infectamos camundongos deficientes de Panexina-1 (Panx-1) total ou somente em células T. O número de células T CD4⁺ residentes no pulmão foi reduzido somente com a deficiência total de Panx-1. Portanto, estes dados indicam que o reconhecimento parácrino de eATP via P2RX7 regula a residência de células T CD4⁺ no pulmão, determinando o destino de doenças infecciosas locais.

Palavras chaves: Células T CD4⁺, dano pulmonar, infecção pulmonar e P2RX7.

ABSTRACT

CD4⁺ T cells participate in the immune response of several lung diseases. In infectious diseases that affect the lungs, CD4⁺ T cells response can generate protection or aggravation. During tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis*, CD4⁺ T cell response is regulated by the lung tissue, which controls the excessive entry of these cells into the lung parenchyma. This is a mechanism that prevents damage to organs that have low regenerative capacity. However, some severe diseases can induce unregulated entry of T cells, as in infections with mycobacterial hypervirulent strains and the Influenza virus. In this context, it is still unclear which mechanisms regulates the entry of these cells into the lung tissue during these infections and their consequences. Therefore, this study sought to understand the role of resident CD4⁺ T cells in generating lung damage and worsening lung infections and the mechanisms involved in this process. For this, we used models of severe pulmonary infection induced by *Mycobacterium bovis* (MP287) and Influenza virus (PR8). Infection with the MP287 strain induces severe lung injury that is associated with high numbers of resident CD4⁺ T cells in C57BL/6 (WT) mice. CD4⁺ T cell depletion 21 days p.i. prevented the worsening of infection. Next, we transferred intermediate (1×10^6) and high (3×10^6) numbers of CD4⁺ T cells to infected *Cd4*^{-/-} mice. As a result, only mice that received high numbers of CD4⁺ T cells developed severe tuberculosis. Severe tuberculosis induces the release of high levels of extracellular ATP (eATP) that is recognized by the purinergic receptor P2RX7. The eATP-P2RX7 interaction is crucial for the generation of resident T cells. Additionally, P2RX7 is highly expressed on lung-resident CD4⁺ T cells during MP287 infection. In this way, we evaluated whether P2RX7 expression can regulate CD4⁺ T cell residence during MP287 infection. *P2rx7*^{-/-} and *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* mice were infected and developed mild tuberculosis associated with low numbers of lung-resident CD4⁺ T cells. After co-transfer of CD4⁺ T cells isolated from WT and *P2rx7*^{-/-} mice to *Cd4*^{-/-} mice, we found mostly WT CD4⁺ T cells in the lung parenchyma, while *P2rx7*^{-/-} CD4⁺ T cells were mainly located in the vasculature. To assess whether this phenomenon is an infection-specific or not, we used the model of viral infection with the PR8 strain. P2RX7 deficiency in T cells prevented severe inflammation and fibrosis formation in the lung during PR8 infection. In addition, lung-resident CD4⁺ T cells are reduced in P2RX7-deficient mice. To understand the molecular pathways involved in this phenomenon, lung-resident CD4⁺ T cells were isolated from the lung 7 days p.i. with PR8 to RNAseq analysis. The data demonstrate that P2RX7-deficient resident CD4⁺ T cells have reduced expression of genes related to cell migration and proliferation such as: *Cxcr3* and *Mki67*. These data indicate that the eATP-P2RX7 interaction in the lung during infections induces the accumulation of CD4⁺ T cells in the tissue, increasing the migration and proliferation of these cells. To understand what is the source of eATP in the lung tissue that CD4⁺ T cells use during PR8 infection, we infected Panexin 1 (Panx-1) mice deficient full or only in T cells. The number of lung-resident CD4⁺ T cells were reduced only with total Panx-1 deficiency. Therefore, these data indicate that the paracrine recognition of eATP via P2RX7 regulates the residence of CD4⁺ T cells in the lung, determining the fate of local infectious diseases.

Keywords: CD4⁺ T cells, Lung damage, Lung Infection and P2RX7.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais células imunes no pulmão de mamíferos.....	26
Figura 2: Grau de tolerância dos órgãos ao dano.....	28
Figura 3: Incidência mundial da tuberculose em 2020.....	29
Figura 4: Patogênese da tuberculose.	31
Figura 5: Resposta imune celular contra o <i>Mtb</i>	33
Figura 6: Localização e resposta de células T CD4 ⁺ no pulmão com tuberculose.....	37
Figura 7: Áreas sazonais de risco para influenza: novembro-abril (azul), abril-novembro (vermelho) e durante todo o ano (amarelo).....	39
Figura 8: Resposta primária de células T CD4 ⁺ e geração de memória na infecção pelo vírus Influenza.....	44
Figura 9: Reconhecimento e hidrólise do eATP.....	46
Figura 10: Papel dual do receptor P2RX7 na infecção por <i>Mtb</i>	49
Figura 11: Efeitos da sinalização purinérgica na ativação de células T.....	50
Figura 12: Infiltrado e fenótipo de células T CD4 ⁺ no pulmão durante a tuberculose grave causada pela cepa <i>Mbv</i> MP287.....	64
Figura 13: Efeitos das células T CD4 ⁺ residentes na gravidade da tuberculose pulmonar causada pela cepa <i>Mbv</i> MP287.....	66
Figura 14: Efeitos da sinalização via P2RX7 na residência de células T CD4 ⁺ e no agravamento da tuberculose pulmonar causada pela cepa <i>Mbv</i> MP287.....	68
Figura 15: Efeitos da expressão intrínseca de P2RX7 em células T no agravamento da pulmonar causada pela cepa <i>Mbv</i> MP287.....	70
Figura 16: Habilidade de números intermediários de células T CD4 ⁺ WT e <i>P2rx7</i> ^{-/-} em acessar o parênquima pulmonar para transferir proteção para camundongos <i>Cd4</i> ^{-/-} infectados.....	73
Figura 17: Efeitos da sinalização via P2RX7 na residência de células T CD4 ⁺ no pulmão na tuberculose grave causada pela cepa <i>Mbv</i> MP287.....	74
Figura 18: Fenótipo das células T CD4 ⁺ WT e <i>P2rx7</i> ^{-/-} residentes no pulmão durante a tuberculose grave causada pela cepa <i>Mbv</i> MP287.....	76
Figura 19: Fenótipo das células T CD4 ⁺ WT e <i>P2rx7</i> ^{-/-} no mLN durante a tuberculose grave causada pela cepa <i>Mbv</i> MP287.....	78

Figura 20: Papel do receptor P2RX7 expresso por células T na inflamação pulmonar causada pelo vírus Influenza.....	80
Figura 21: Papel do receptor P2RX7 no estabelecimento de células CD4 ⁺ residentes no durante a infecção pelo vírus Influenza.....	82
Figura 22: Efeitos da sinalização via P2RX7 na residência de células T CD4 ⁺ no pulmão na infecção pelo vírus Influenza.....	83
Figura 23: Efeitos da expressão intrínseca de P2RX7 na expressão de moléculas de proliferação celular e adesão tecidual em células T CD4 ⁺ residentes do pulmão.....	85
Figura 24: Efeitos dos canais de Panx-1 na infecção pelo vírus Influenza e na residência de células T CD4 ⁺	87
Figura 25: Ilustração esquemática mostrando o papel da interação eATP-P2RX7 na residência de células T CD4 ⁺ e suas implicações no agravamento de infecções pulmonares.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	do inglês, <i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
ADAM	do inglês, <i>ADAM Metalloproteinase domain 1</i>
ADC	Albumina, Dextrose e Catalase
ADP	Adenosina Difosfato
ART	do inglês, <i>ADP-ribosyltransferase</i>
AS	Ácido Siálico
ATP	Adenosina Trifosfato
BALT	Tecido Linfoide Associado aos Brônquios
BBG	do inglês, <i>Brilliant blue G</i>
Ca ⁺	Cálcio
CD	do inglês, <i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CCR	β -Chemokine Receptors
CFU	do inglês, <i>Colony-Forming Unit</i>
CTL	Linfócito T Citotóxico
CXCR	α -Chemokine Receptors
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DCs	Células Dendríticas
D.O.	Densidade Ótica
eATP	Adenosina Trifosfato Extracelular
EDTA	do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ERK	do inglês, <i>Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases</i>
ESAT-6	do inglês <i>Early-secreted target antigen</i>
ESX-1	do inglês <i>Esat-6 secretion system 1</i>
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos
H	Hemaglutinina
HE	Hematoxilina-Eosina
HEVs	Vênulas de Endotélio Alto
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAV	Influenza vírus A
IBV	Influenza vírus B
ICV	Influenza vírus C

IDV	Influenza vírus D
iBALT	Tecido Linfoide Induzido Associado aos Brônquios
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
I.N.	Intranasal
IRF	Fator Regulador de Interferon
I.T.	Intratraqueal
I.V.	Intravenoso
K ⁺	Potássio
KLRG1	do inglês, <i>Killer Cell Lectin Like Receptor G1</i>
MDR-TB	Tuberculose Multidroga Resistente
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mLN	Linfonodo Mediastinal
MMP	Metaloproteinase da Matriz
mRNA	RNA mensageiro
MUC	Mucina
MT	Tricoma de Masson
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mbv</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
N	Neuraminidase
NAD ⁺	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido
NB-2	Laboratório de Biossegurança Nível 2
NB-3	Laboratório de Biossegurança Nível 3
NFAT	do inglês, <i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NK	do inglês, <i>Natural Killer Cell</i>
NO	Óxido Nítrico
OADC	Oleato, Albumina, Dextrose e Catalase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
P2R	do inglês, <i>Purinergic Receptor 2 Family</i>
P2RX	do inglês, <i>P2X receptors</i>
P2RY	do inglês, <i>P2Y receptors</i>
PBS	Solução Fosfatada Tamponada

PD-1	do inglês, <i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
P.I.	Pós infecção
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrões
RANTES	do inglês <i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RIG-1	Gene I Induzível por Ácido Retinóico
RNA	Ácido Ribonucleico
S100A9	do inglês, <i>S100 calcium-binding protein A9</i>
SI	Sistema Imunológico
SFB	Soro Fetal Bovino
SPF	Livre de Patógenos Específicos
SR	Sistema Respiratório
ssRNA	RNA Fita Simples
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tfh	Linfócito T Folicular
Th	Linfócito T Auxiliar
TLR	Receptor do Tipo Toll
TM	Transmembrana
Treg	Linfócito T Reguladora
TRM	Célula T de Memória Residente
tSNE	do inglês, <i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
XDR-TB	Tuberculose Extensivamente Resistente
WT	do inglês <i>Wild type</i>

SUMÁRIO

1	Introdução	24
1.1.	Imunologia pulmonar	25
1.2.	A tuberculose	28
1.3.	Resposta imune na tuberculose	30
1.4.	Resposta de células T CD4 ⁺ na tuberculose	35
1.5.	A gripe sazonal causada pelo vírus Influenza	38
1.6.	Resposta imune na infecção pelo vírus Influenza	40
1.7.	Resposta de células T CD4 ⁺ na infecção pelo vírus Influenza	43
1.8.	Efeitos do reconhecimento do ATP extracelular	45
1.9.	Efeitos da sinalização via P2RX7 em células T CD4 ⁺	49
2	Objetivos	52
2.1.	Geral	53
2.2.	Específicos	53
3	Metodologia	54
3.1.	Animais	55
3.2.	<i>Mycobacterium bovis</i>	55
3.3.	Vírus influenza	56
3.4.	Infecção dos camundongos	56
3.5.	Depleção de células T CD4 ⁺	56
3.6.	Purificação de células T CD4 ⁺ e transferência adotiva	57
3.7.	Marcação intravascular	57
3.8.	Processamento pulmonar e preparação das células	57
3.9.	Análises por citometria de fluxo	58
3.10.	Análise histológica	58
3.11.	Quantificação do CFU	58
3.12.	Quantificação da carga viral	59

3.13. Microscopia confocal	59
3.14. Geração de quimeras mistas de medula óssea.....	59
3.15. Análises por RNA-sequencing.....	60
3.16. Análises estatísticas	60
4 Resultados	61
Capítulo 1	62
Papel do receptor P2RX7 em células T CD4 ⁺ na tuberculose pulmonar grave..	62
4.1. Células T CD4 ⁺ residentes efetoras agravam a tuberculose pulmonar....	62
4.5. A expressão de P2RX7 em células T aumenta a residência de células T CD4 ⁺ efetoras no parênquima pulmonar resultando em tuberculose grave...	69
4.6. Números intermediários de células T CD4 ⁺ residentes do pulmão levam à proteção mediada por P2RX7 contra formas graves de tuberculose.....	71
4.7. O receptor P2RX7 promove a residência de células T CD4 ⁺ efetoras controlando a expressão de CXCR3 e a proliferação celular na tuberculose grave	74
Capítulo 2	79
Papel do receptor P2RX7 em células T CD4 ⁺ na infecção pelo vírus Influenza .	79
4.8. O P2RX7 intrínseco das células T é crucial para a inflamação pulmonar e o estabelecimento de células T CD4 ⁺ residentes na infecção pelo vírus Influenza	79
4.9. A sinalização via P2RX7 em células T CD4 ⁺ residentes leva ao aumento da expressão de genes relacionados à migração e proliferação celular durante a infecção pelo vírus Influenza	84
4.10. A liberação parácrina de eATP através dos canais panexina-1 regula a entrada de células T CD4 ⁺ no parênquima pulmonar	86
5 Discussão	88
6 Conclusão	96
REFERÊNCIAS.....	98

APÊNDICE A - Estratégia de <i>gates</i> utilizadas para a análise de células T CD4 ⁺ parenquimatosas e intravasculares.....	114
APÊNDICE B – Efeitos das células T CD4 ⁺ residentes no pulmão na inflamação e dano pulmonar na tuberculose causada pela cepa <i>Mbv</i> MP287.....	116
APÊNDICE C - P2X7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology , 2021.	118
APÊNDICE D - Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria. The Journal of Infectious Diseases , 2021.....	119
APÊNDICE E - Antitubercular and immunomodulatory activities of <i>Eugenia astringens</i> n-hexane fraction. Phytomedicine Plus , 2022.....	120

1 Introdução

1.1. Imunologia pulmonar

Os pulmões são órgãos vitais cônicos localizados na cavidade torácica e têm a função de extrair oxigênio do ar, transferi-lo para corrente sanguínea e eliminar dióxido de carbono para a atmosfera (TORTORA, 2018). Os pulmões evoluíram para a forma atual encontrada em mamíferos a partir de sacos aéreos descritos em fósseis de peixes marinhos do gênero *Bothriolepis* (LIEM, 1988). Para manter a homeostase, os pulmões precisam interagir com outros sistemas do corpo humano, como Sistema Imune (SI), por exemplo. Esta necessidade se torna mais clara quando pensamos que o contato direto com o ar torna o órgão mais exposto a toxinas, alérgenos e até mesmo patógenos que são inalados durante a respiração (KUMAR, 2020).

O contato com diferentes tipos de antígenos faz com que os pulmões tenham uma assinatura imunológica específica e independente de uma resposta imune sistêmica (LIPSCOMB et al., 1995; KUMAR, 2020). Muitos pesquisadores vêm estudando a resposta imune nos pulmões, criando um grande campo de discussão que pode ser denominado como imunologia pulmonar. Antigos estudos em coelhos demonstraram que o inóculo intranasal (i.n.) de pneumocócico foi capaz de gerar proteção contra reinfecções sem gerar uma resposta imunológica sistêmica (BULL et al., 1929). Ainda nesta linha, há algumas décadas os cientistas Askonas e Humphrey demonstraram que após a imunização sistêmica com antígenos de pneumocócico os anticorpos de maior especificidade eram gerados somente nos pulmões (ASKONAS & HUMPHREY, 1958).

Quando se estuda a divisão imunológica do tecido pulmonar saudável é possível entender como a imunidade local citada anteriormente é gerada. A presença do SI no pulmão pode ser dividida de acordo com a localização das células imunes no tecido (MCDERMOTT et al., 1982). Na parte superior dos pulmões encontra-se a mucosa onde os anticorpos do tipo IgA são predominantes, também se observa glândulas e vias aéreas periféricas. As vias aéreas periféricas não possuem tecido mucoso e a classe de anticorpos produzidos predominante é IgG. Esta região está em contato direto com as células broncoalveolares que são majoritariamente macrófagos (90%) e uma pequena quantidade de linfócitos (10%) (MCDERMOTT et al., 1982). O epitélio pulmonar é muito importante como primeira linha de defesa, gerando uma barreira física que protege o pulmão da entrada de antígenos que podem ser nocivos

ao tecido (Kumar, 2020). Além disso, o tecido epitelial pulmonar é um importante compartimento para a acomodação de células imunes como linfócitos epiteliais (BIENENSTOCK et al., 1973). No interior da parede dos brônquios estão as células linfoides respiratórias que formam pequenos agregados celulares que se assemelham as placas de peyer (BIENENSTOCK et al., 1973b) (**Figura 1**).

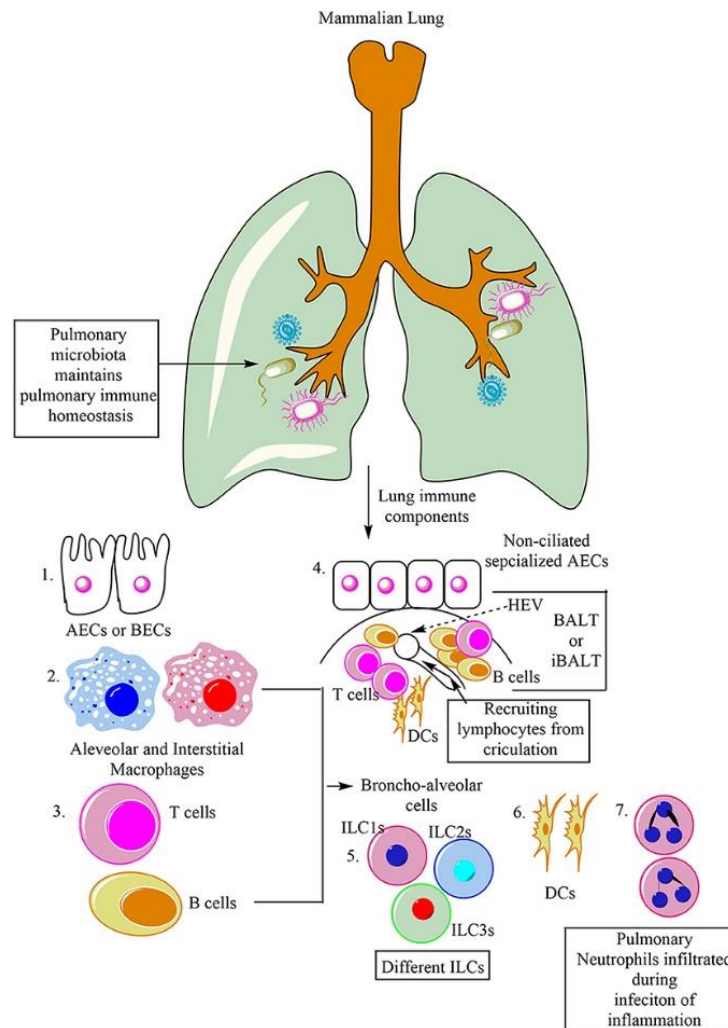


Figura 1: Principais células imunes no pulmão de mamíferos.

Fonte: Kumar et al., 2020.

O conjunto de células e estruturas citadas acima juntas formam o tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) (RICHMOND et al., 1993; BIENENSTOCK, 1982). O BALT é encontrado no pulmão saudável de crianças e adolescentes, desaparecendo na vida adulta e retornando somente em caso de doenças inflamatórias crônicas (KIMURA et al., 2019). Os principais componentes celulares do BALT são as células B produtoras de IgA. Zonas de células T também são encontradas e há interação com células dendríticas também localizadas nesta região. No BALT também há presença

de vênulas de endotélio alto (HEVs) que contribui para o transporte de linfócitos entre circulação e tecido (MCDERMOTT et al., 1982; SATO, 2000). Os linfócitos também chegam pelos vasos sanguíneos de forma regulada e patrulham o tecido (BIENENSTOCK, 1984).

Até aqui é possível compreender que os pulmões possuem um tecido imunológico associado que é responsável por proteger e manter sua homeostase (BIENENSTOCK, 1984; KUMAR, 2020). Sendo assim, o tecido pulmonar pode ser considerado um sítio imunoregulado, onde há células imunes programadas para responderem naquele local de acordo com as especificidades do tecido (MEDZHITOV et al., 2012). O pulmão não é um órgão que permite respostas imunes agressivas. Um exemplo disso é que as células imunes que residem no tecido saudável possuem um perfil regulador e reparador. Os macrófagos alveolares, por exemplo, não são bons apresentadores de antígenos e não podem ser ativados como macrófagos convencionais, sendo responsáveis apenas pela limpeza do tecido (MIYATA & EEDEN, 2011). Da mesma forma, os linfócitos T localizados no tecido possuem perfil Th2 caracterizados pela produção de IL-4 (MEYER, 2001). Além disso, a circulação de células provenientes da circulação no pulmão é regulada para que não haja excesso de células infiltradas e atrapalhe a fisiologia respiratória (SAKAI et al., 2014). Esta estratégia do pulmão é possivelmente um mecanismo de defesa para proteção contra danos graves, uma vez que o pulmão não possui alta capacidade regenerativa.

A magnitude da imunopatologia causada por doenças infecciosas é consequência da intensidade e duração da resposta imune (MEDZHITOV et al., 2012). A intensidade da resposta imune também é determinada pela sensibilidade do tecido ao dano e sua capacidade regenerativa. O pulmão é um órgão vital de baixa tolerância ao dano (**Figura 2**). Este órgão possui uma linha tênue entre uma resposta imune efetiva e a geração de dano (RAVIMOHAN et al., 2018). Uma resposta desregulada das células imunes no pulmão pode causar danos teciduais graves e comprometer a fisiologia respiratória. Isso é o que acontece em processos inflamatórios graves causados por infecções pulmonares como tuberculose, COVID-19 e infecção pelo vírus Influenza, por exemplo (RAVIMOHAN et al., 2018, AMARAL et al., 2014; KLOMP et al., 2021; VON DER THÜSEN & VAN DER EERDEN, 2020).

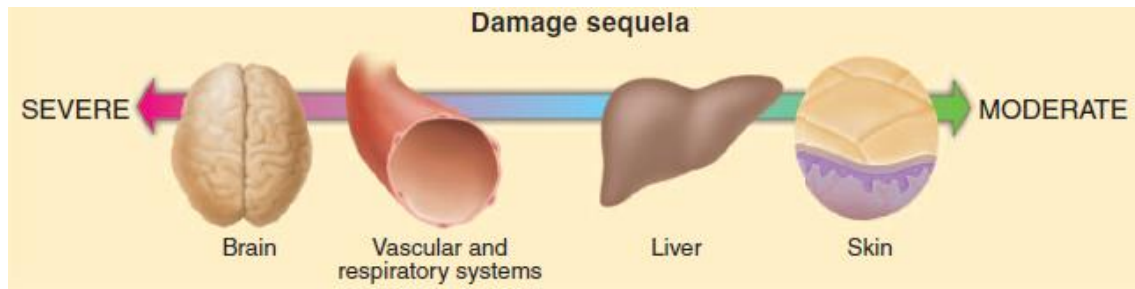


Figura 2: Grau de tolerância dos órgãos ao dano.

Fonte: Medzhitov et al., 2012.

1.2. A tuberculose

A tuberculose, embora seja uma doença curável, continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade a nível mundial (WHO, 2021). Ela é causada principalmente por um dos patógenos mais prevalentes no mundo, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), um microrganismo que apesar de infectar outros órgãos, possui tropismo pelos pulmões. Isso faz deste órgão o principal alvo para infecção pelo *Mtb* (NUNN et al., 2005). Estudos históricos demonstraram que *Mtb* tem infectado humanos desde a antiguidade. Pesquisas realizadas em múmias egípcias revelaram a presença de sinais patológicos da tuberculose na coluna espinhal de algumas delas. Contudo, somente em 1882 o médico alemão, Robert Koch, identificou que a tuberculose era causada pelo bacilo (PIANTA & CAMPOS, 2001).

Mtb assim como todas as micobactérias, pertencem à ordem Actinomycetes, a família Mycobacteriaceae e ao gênero *Mycobacterium*. O gênero é composto por muitas micobactérias patogênicas, de elevada importância clínica. Muitos destes patógenos são capazes de causar doenças graves em humanos saudáveis, como a tuberculose (*M. tuberculosis*) e a hanseníase (*M. Leprae*), enquanto outras espécies são oportunistas desencadeando a doença em humanos imunodeficientes, como o *M. kansasii* (DAI et al., 2011). A parede celular micobacteriana possui uma membrana externa que se assemelha à parede celular de bactérias gram-positivas. Apesar desta semelhança, não possuem peptidoglicanos, tais como N-acetilmurâmico, mas o N-glicolilmurâmico. Sessenta por cento da parede celular micobacteriana é formada por ácidos graxos de cadeia longa, principalmente os ácidos micólicos, que por ligação covalente se associam aos polissacarídeos da parede celular, o que dificulta a entrada de nutrientes embora aumente a resistência celular a degradação enzimática. As micobactérias possuem em sua membrana celular proteínas chamadas de porinas que formam canais catiônicos para o controle da difusão de moléculas hidrofílicas.

Estas características da parede celular micobacteriana possibilita a sobrevivência e colonização do micro-organismo no interior de macrófagos, células do sistema imunológico especializadas na fagocitose e na eliminação de agentes patogênicos. A fase intracelular acarreta em proteção e maior resistência micobacteriana a substâncias antimicrobianas (TRABULSI & RACHILD, *et al.*, 2008).

Na maioria dos casos de tuberculose pulmonar, os pacientes apresentam sintomas como tosse por mais de duas ou três semanas, falta de apetite, perda de peso, suores noturnos e febre (NUNN *et al.*, 2005). Esta doença mostrou-se progressivamente incidente nos últimos anos, tornando-se um problema de escala mundial (WHO, 2020; WHO, 2019; WHO, 2018). Diante deste cenário, um número estimado de 7 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose em 2018, sendo deste total, 2 milhões de casos em coinfeção ao HIV e 1 milhão de casos multidroga-resistentes (MDR-TB) (WHO, 2019). Em 2019, 7.1 milhões de casos de tuberculose foram registrados e o número estimado de casos fatais decorrentes da infecção pelo *Mtb* atingiu 1,4 milhão em todo o mundo, tornando a tuberculose uma das dez principais causas de morte no mundo (WHO, 2020). Em decorrência da pandemia de COVID-19, em 2020 houve uma grande queda na incidência de tuberculose a nível mundial, sendo registrados 5.8 milhões de casos (**Figura 3**) (WHO, 2021).

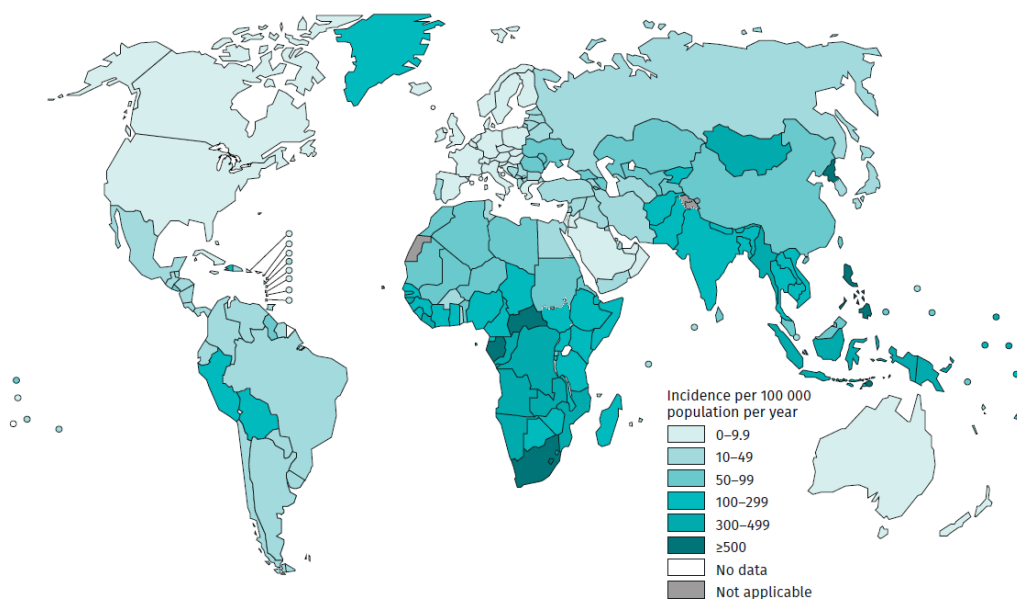


Figura 3: Incidência mundial da tuberculose em 2020.

Fonte: WHO, 2021.

O tratamento padrão para tuberculose está bem estabelecida pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE), sendo composto pelos fármacos rifampicina, estreptomicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (ZHANG et al., 2006). Em cerca de 95% dos casos de tuberculose desenvolvida pela primeira vez não se observa resistência aos fármacos do tratamento padrão, com uma taxa de sucesso de 86% (WHO, 2015). O tratamento é realizado no período de 6 meses a 1 ano dependendo do quadro, resposta clínica do paciente e adequação ao tratamento (WHO,2020). O longo período de tratamento é um dos maiores motivos para a má adesão à terapia, abandono da terapia e consequente surgimento de novos casos de Tuberculose Multidroga Resistente (MDR-TB). Em casos de resistência aos medicamentos de primeira linha, adota-se o tratamento com os fármacos de segunda linha e terceira linha, os quais geralmente são injetáveis. Estes possuem um alto custo e muitos efeitos adversos, além da baixa efetividade nos pacientes com HIV (JANIN, 2007).

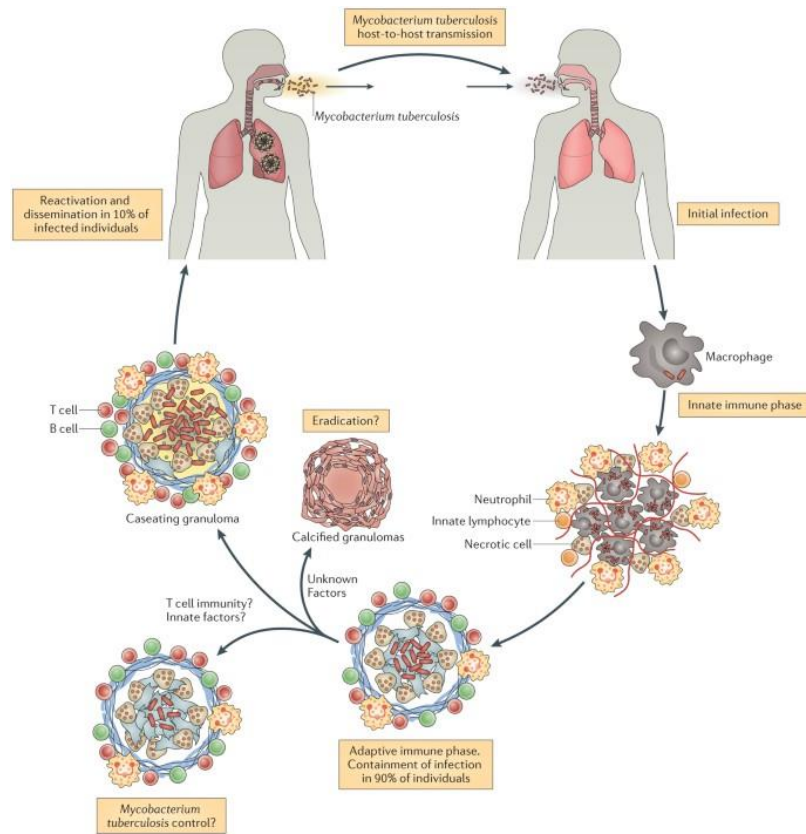
Alguns fatores determinam a incidência, curso da infecção e a severidade da tuberculose, sendo eles: o aparecimento de novas cepas resistentes à medicamentos disponíveis no mercado, o aumento dos casos de coinfeção com o HIV, desnutrição, tabagismo, alcoolismo, diabetes, poluição, baixa condição socioeconômica e a virulência da cepa infectante (KOUL et al., 2011 e KUMAR et al., 2011). Cepas hipervirulentas provocam uma inflamação grave, associada a alta carga bacilar e elevado nível de áreas de dano e necrose pulmonar (RIBEIRO et al., 2014; AMARAL et al., 2014).

1.3. Resposta imune na tuberculose

Durante a infecção micobacteriana, os pulmões entram em contato com o microrganismo após a inalação de aerossol contendo *Mtb* provenientes de um indivíduo infectado. O aerossol inalado passa pelo trato respiratório superior e atinge os pulmões onde os bacilos são fagocitados por macrófagos e células dendríticas (DCs) alveolares (DHEDA et al., 2010; ORME, 2011; OGARRA et al., 2013).

Após a infecção, o bacilo pode ser eliminado, manter-se em latência ou desencadear uma infecção produtiva (**Figura 4**) (NUNES-ALVES et al., 2014). O indivíduo infectado por *Mtb* em estágio latente pode desenvolver a fase ativa da doença quando há ocorrência de uma supressão de sua vigilância imunológica, o que

explica o aumento do número de casos de tuberculose em pacientes com HIV (VAN CREVEL et al., 2002). Embora, a resposta imune inata na tuberculose tenha baixo efeito antibacteriano inicial no combate ao patógeno, ela possui um importante papel na geração de um ambiente adequado para o início da resposta imune adaptativa.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 4: Patogênese da tuberculose.
 Fonte: Nunes-Alves et al., 2014.

O reconhecimento do bacilo pelos macrófagos e DCs envolve uma cascata de sinalização via interação de moléculas presentes nas micobactérias e receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na superfície dos fagócitos (TLR-2, CD14, receptor de manose, receptores *scavenger* e receptores do complemento: CR1, CR2 e CR4). Tal reconhecimento induz reorganização do citoesqueleto do fagócito, processo envolvido na ativação da fagocitose do bacilo (LASUNSKAIA et al., 2006). Após serem fagocitadas, as micobactérias podem persistir no organismo se utilizando de mecanismos de evasão, tais como a modificação da composição do fagossoma e inibindo a fusão do fagossoma com o lisossoma (CLEMENS, 1996; GLICKMAN et al., 2001; PIETERS, 2001; JAYACHANDRAN et al., 2007).

A ativação dos macrófagos e DCs induz produção de mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas IL-1, IL-6, IL-12 e IL-8, TNF- α , GM-CSF, RANTES e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que ativam células endoteliais dos capilares sanguíneos adjacentes a expressarem moléculas de adesão, possibilitando o recrutamento e a diapedese de outras células inflamatórias como monócitos, DCs e neutrófilos para o local da infecção (ORME, 1987; FLYNN et al., 1992; ORME et al., 1992; ORME et al., 1993; KAUFMANN, 2001).

Apesar de a resposta adaptativa ser mais eficiente no controle da infecção pelo *Mtb*, alguns fatores do bacilo como genética, virulência, dentre outros, podem atrasar a resposta. Por exemplo, algumas cepas podem inibir ou retardar a migração das DCs infectadas aos linfonodos, onde ocorre a apresentação de antígeno para os linfócitos T, a fim de iniciar a resposta imune adaptativa (ERNST, 2012; OTTENHOFF & KAUFMANN, 2012).

A resposta imunológica mediada por células é predominante em infecções micobacterianas. As células T ativadas iniciam a produção de IFN- γ , acelerando a infiltração celular no local da lesão e ativando ainda mais os macrófagos na resposta contra os bacilos. A presença de células T CD4⁺ Th1 e a produção de IFN- γ e TNF- α conduzem ao desenvolvimento e organização do granuloma, estrutura característica da resposta imunológica na tuberculose, que contribui para a contenção do crescimento micobacteriano (NUNES-ALVES et al., 2014).

A estrutura do granuloma é basicamente composta de macrófagos infectados, macrófagos epitelióides, *foam cell* (macrófagos espumosos que acumulam lipídeos) e neutrófilos no interior da estrutura, assim como linfócitos, na periferia. (SAUNDERS et al., 1999; COOPER, 2009).

Além dos macrófagos e linfócitos T CD4⁺ Th1, outras células envolvidas na resposta imune nos casos de TB vêm sendo estudadas. As células T CD8⁺, por exemplo, interagem com os fagócitos, que podem apresentar produtos micobacterianos, secretados no citosol celular via sistema ESX-1 micobacteriano, através da apresentação cruzada. Uma vez ativadas, as células TCD8⁺ contribuem para a amplificação da resposta dos macrófagos através da produção de IFN- γ e induzindo a morte das células infectadas via indução de FAS, FASL ou perforinas e granzimas (**Figura 5**) (NUNES-ALVES et al., 2014; CANADAY et al., 2001; FERRAZ et al., 2006). As células T CD4⁺ Th17 também participam da resposta imune contra micobactérias através da secreção das quimiocinas e IL-17, auxiliando no

recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e contribuindo para a formação do granuloma (KHADER & COOPER, 2008).

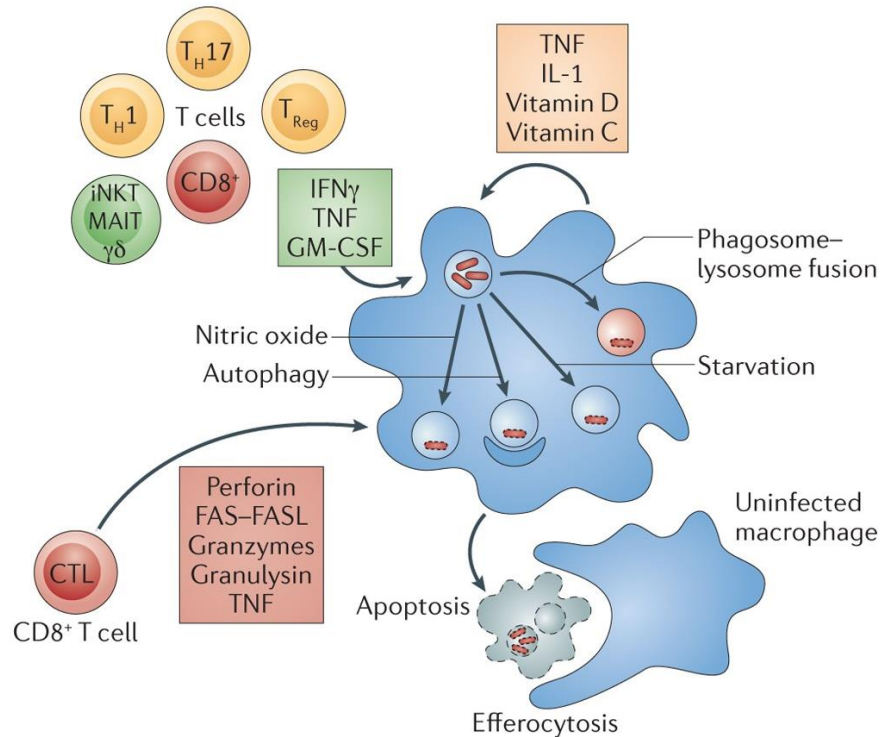


Figura 5: Resposta imune celular contra o *Mtb*.

Fonte: Nunes-Alves et al., 2014.

A proliferação micobacteriana descontrolada no interior dos macrófagos e a secreção de antígenos micobacterianos, como ESAT-6 em altas concentrações, conduzem estas células à morte por necrose e a liberação dos bacilos, podendo infectar novas células permissíveis e iniciar um novo ciclo de replicação (PARK et al., 2005). Além da disseminação do *Mtb*, a liberação de material intracelular proveniente da necrose celular, como os DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) ou alarminas, quando reconhecidos pelos macrófagos no local da lesão impulsionam a ativação de uma cascata de sinalização, induzindo a formação de inflamassomas, produção de citocinas inflamatórias e morte celular (DI VIRGILIO et al., 2001). A resposta imunológica gerada após o reconhecimento dos DAMPs pode exacerbar a resposta inflamatória pulmonar e agrava o quadro patológico do paciente infectado (AMARAL et al., 2014; BOMFIM et al., 2017). A respeito dos DAMPs, existe uma extensa lista de estas moléculas, incluindo citocinas (IL-1 α , IL-1 β e IL-18), proteínas de choque térmico, defensinas, anexinas e galectinas. A adenosina trifosfato

extracelular (eATP) também é uma alarmina, a qual é reconhecida por receptores purinérgicos do tipo P2: P2RX e P2RY (BIANCHI, 2007; LOTZE et al. 2007; SATO et al., 2009; BURNSTOCK et al., 2010; COUTINHO-SILVA & Ojcius, 2012).

Os neutrófilos anteriormente subestimados na resposta imune da tuberculose têm sido associados a geração de dano tecidual em pacientes com quadro severo de infecção por *Mtb*. Ao se acumularem no local de infecção, aumentam a produção de fatores microbicidas como, por exemplo, o oxigênio reativo, as mieloperoxidases e as metaloproteinases (MMPs), que quando produzidos de forma descontrolada são citotóxicos, ocasionando a morte das células ao redor, propiciando a liberação de maior quantidade de fatores relacionados ao dano culminando no extenso dano tecidual nos pulmões dos pacientes (TORRADO et al., 2011; ORME, 2014; ALMEIDA et al., 2017; BOMFIM et al., 2021).

Manifestações graves da tuberculose pulmonar podem estar acompanhadas da formação de cavidades no pulmão. A formação de tais cavidades é promovida pelo contato do crescente granuloma necrótico em lesões primárias com espaços aéreos não danificados, o que possibilita o esvaziamento dos centros necróticos (cáseos). Contudo, o aparecimento das cavidades está fortemente associado a uma resposta inflamatória exacerbada. Esta é descrita como pneumonia tuberculosa lipídica, envolvendo o encontro de macrófagos espumosos com o bacilo inalado ou provenientes de sítios infectados no interior dos alvéolos pulmonares. Isso conduz uma rápida e forte resposta necrótica com grande produção de mediadores inflamatórios, como MMP-1 ou outras collagenases responsáveis pela clivagem de colágeno e a formação da cavidade (HUNTER et al., 2011; DARTOIS, 2014 e ORME, 2014).

Sob este prisma, apesar resposta imune contra o bacilo ser essencial para a defesa do paciente, em casos graves, o estado inflamatório exacerbado aumenta de forma descontrolada o recrutamento de novas células imunes para o local de infecção e conseqüente produção aumentada de mediadores inflamatórios. A resposta inflamatória exacerbada causada por células T CD4⁺ Th1, por exemplo, torna-se uma das maiores causas de dano tecidual. Desta forma, é necessário encontrar o limiar entre uma resposta de células T CD4⁺ que seja eficiente no controle micobacteriano sem causar danos ao pulmão.

1.4. Resposta de células T CD4⁺ na tuberculose

As células T CD4⁺ participam da resposta imune de muitas doenças pulmonares, incluindo a tuberculose (BROWN et al., 2004; MCDERMOTT e KLEIN, 2018; SAKAI et al., 2014; SWADLING & MAINI, 2020). Nestas infecções, o acúmulo de subconjuntos distintos de células T CD4⁺ pode mediar a proteção ou o agravamento da doença.

Classicamente, sabe-se que a resposta de células T CD4⁺ é essencial para o controle da replicação micobacteriana (MOGUES et al., 2001). Este fato é claramente demonstrado na infecção de camundongos *knockout* de CD4⁺ e de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe II, que morrem rapidamente após a infecção comparados a camundongos *Wild type* (WT) (CARUSO et al., 1999). O comprometimento no controle bacilar, também foi demonstrado em modelos utilizando macacos, onde as células T CD4⁺ foram depletadas com anticorpos. Nestes animais, não apenas o controle do bacilo foi comprometido, mas também levou a reativação da tuberculose latente (LIN et al., 2012).

O início da resposta de células T CD4⁺ na tuberculose define o curso e o resultado da infecção (SIA et al., 2019). Em camundongos, a resposta de células T CD4⁺ específicas para antígenos micobacterianos é detectada somente duas semanas após a infecção nos linfonodos de drenagem pulmonar. Já no pulmão, só é identificada uma resposta realmente significativa após três semanas de infecção. Esta resposta atrasada de células T CD4⁺ é um contraste com outras infecções bacterianas (FLYNN et al., 1995). Este atraso pode ser atribuído a diversos fatores, como: lento crescimento micobacteriano, atraso da migração de DCs, dentre outros (SIA et al., 2019). Juntos, estes fatores permitem o estabelecimento da infecção no pulmão.

A qualidade da resposta de células T CD4⁺ contra micobactérias é relacionada primordialmente com a produção de IFN- γ e IL-12, citocinas produzidas pelo perfil de células T CD4⁺ Th1 (OTTENHOFF et al., 1998). Camundongos deficientes de IFN- γ não são capazes de controlar a infecção pela cepa *Mtb* H37Rv e sucumbem, assim como os camundongos deficientes de IL-12 (FLYNN, 1993; COOPER, 1993). A ausência destas citocinas leva a um estado grave e conseqüente progressão da tuberculose pelo fato destes estarem envolvidos na indução de outros mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO) e citocinas que irão contribuir para o aumento do *killing* dos macrófagos infectados e morte dos bacilos (XIE et al., 1994).

A localização das células T CD4⁺ específicas é determinante para a eficiência da resposta mediada por estas células (**Figura 6**). Esse contexto se dá pela necessidade de interação com macrófagos infectados (GAUTAM et al., 2017; MEHRA et al., 2012). Novos estudos têm descrito duas diferentes populações de células T CD4⁺ presentes na vasculatura e parênquima pulmonar. Mais especificamente, as células T CD4⁺ efetoras *Mtb* específicas podem permanecer na circulação e povoar as regiões intravasculares pulmonares ou infiltrar o parênquima pulmonar, estabelecendo residência (ANDERSON et al., 2014). A base molecular intrínseca que determina a localização destas células tem sido objeto de muitos estudos recentes, mostrando, por exemplo, a importância da expressão diferencial do receptor de quimiocina entre esses dois subconjuntos celulares. Em resposta à cepa de baixa virulência *Mtb* H37Rv, as células T CD4⁺ que expressam o receptor de fractalcina CX3CR1 tendem a permanecer na vasculatura e produzem altos níveis de IFN- γ , enquanto as células que expressam o receptor de quimiocina CXC Motif 3 (CXCR3) tendem a estabelecer residência no parênquima e são mais eficazes na contenção da infecção, apesar da menor produção de IFN- γ por célula (SALIN 2017, SAKAI et al., 2014). O nível de expressão de moléculas como CD69, KLRG1 e PD-1 também foi descrito como importante para o estabelecimento de células T CD4⁺ na vasculatura e parênquima pulmonar. Apesar disso, foram os receptores de quimiocina o ponto chave para definir o destino destas células durante a infecção cepa *Mtb* H37Rv (HOFT et al., 2019).

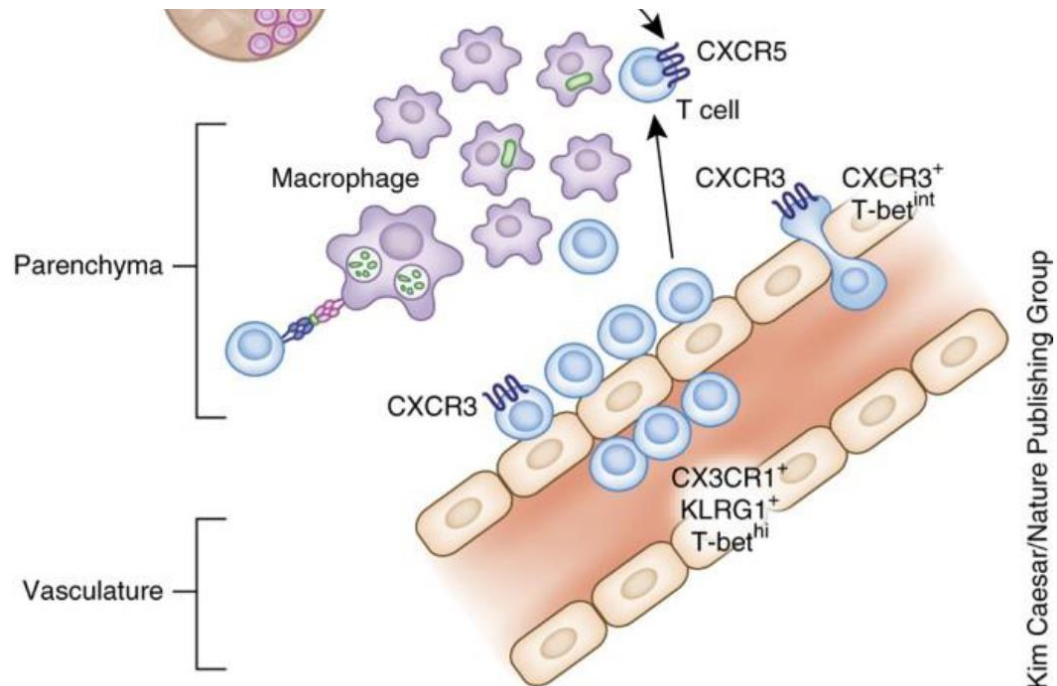


Figura 6: Localização e resposta de células T CD4⁺ no pulmão com tuberculose.

Fonte: Orme et al., 2014.

O equilíbrio entre as respostas imunes protetoras promovidas pelas células T CD4⁺ que são por definição pleiotrópica e seus efeitos não intencionais no parênquima pulmonar define se as células T CD4⁺ residentes no pulmão serão protetoras ou prejudiciais para o tecido. (BARBER, 2017). Danos pulmonares causados por inflamação exacerbada na tuberculose levam à liberação de sinais de danos ou alarminas. Um dos DAMPs mais abundantes liberados durante processos de dano tecidual e morte celular é o eATP (Adenosina Trifosfato Extracelular) (IDZKO et al., 2007). Altos níveis de eATP são reconhecidos principalmente pelo receptor purinérgico P2RX7 (BRANDÃO-BURCH et al., 2012). As células T CD4⁺ são uma das células imunes que expressam maiores níveis de P2RX7, sendo capazes de reconhecer o eATP (SALLES et al., 2017). O receptor P2RX7 é frequentemente associado à geração e manutenção de células T de memória residentes (TRMs) (BORGES DA SILVA et al., 2018, BORGES DA SILVA et al., 2020). Apesar disso, não está claro como o reconhecimento do eATP influencia na residência de células T CD4⁺ e quais os efeitos desse processo.

De fato, as células T CD4⁺ não são dispensáveis no controle micobacteriano na tuberculose, determinando todo o curso da infecção. No entanto, como mencionada anteriormente, a resposta imune relacionada às células T CD4⁺ também pode se

tornar maligna, promovendo uma inflamação excessiva ou tornarem-se ineficazes devido à exposição crônica ao antígeno.

1.5. A gripe sazonal causada pelo vírus Influenza

Historicamente, a gripe é uma doença causada pelo vírus Influenza que causa epidemias todos os anos no mundo inteiro (**Figura 7**) (POTTER, 2021). A gripe é transmitida por vias aéreas através da respiração, fala, tosse e espirro que geram aerossóis (KALIL & THOMAS et al., 2019). Os sintomas desta doença podem ser leves ou graves, iniciando-se 4 dias após o contato com o vírus. Sintomas como febre, coriza, dor de garganta, dores musculares, dor de cabeça, tosse e fadiga são observados (DHARMAPALAN, 2020). Em períodos de epidemias sazonais, é estimado que cerca de 80% das pessoas saudáveis que apresentam tosse ou dor de garganta estejam infectadas pelo vírus Influenza (KRAMMER et al., 2018).

Aproximadamente 5 milhões de casos clínicos de infecção pelo vírus Influenza e 250 mil – 500 mil mortes são notificadas anualmente no mundo inteiro (THOMPSON et al., 2003). Os Estados Unidos e Brasil ainda estão entre os países com maior incidência de gripe. Foram notificados aproximadamente 3,7 milhões de casos de gripe entre outubro de 2021 e fevereiro de 2022 nos Estados Unidos. Dentre estes casos, houve aproximadamente 44 mil hospitalizações e 3 mil mortes por pneumonia associada à infecção pelo vírus influenza (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022). O Brasil registrou 5,8 mil casos e 1,1 mil mortes por influenza em 2019. Em 2020, o número de casos sofreu uma queda, sendo estimado em 1,5 mil infectados e 209 mortos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Estes ainda são números altos para uma doença que possui vacina no calendário de vacinação anual.

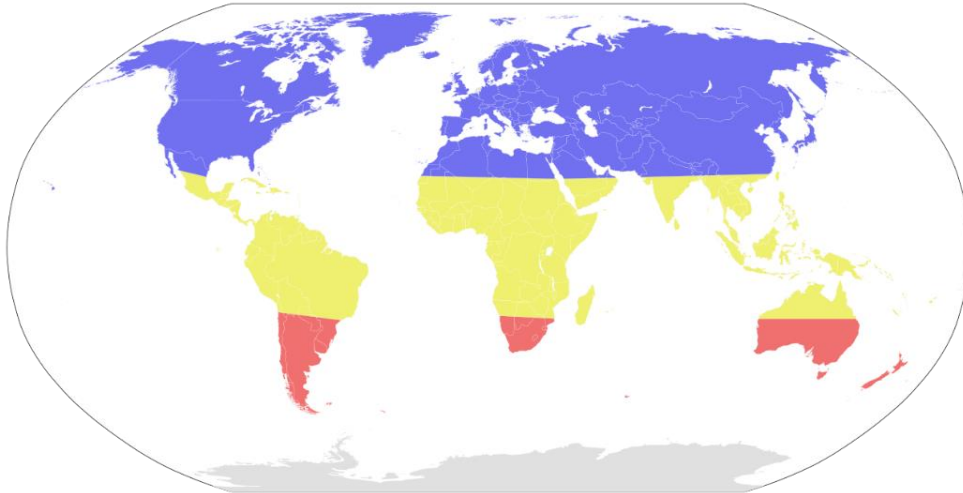


Figura 7: Áreas sazonais de risco para influenza: novembro-abril (azul), abril-novembro (vermelho) e durante todo o ano (amarelo).

Fonte: Ninjatacoshell, 2011.

O vírus Influenza foi isolado em laboratório pela primeira vez em 1932 (POTTER, 2021). O genoma do vírus influenza é composto por RNA de fita simples (ssRNA) segmentado de sentido negativo, que pode sintetizar RNA mensageiro (mRNA) (DHARMAPALAN, 2020). As partículas virais que são chamadas de virions são pleomórficas (isolados clínicos), variando entre as formas filamentosas, baciliforme ou esférica (cepas laboratoriais) (DADONAITE et al., 2016).

Quatro espécies do vírus influenza foram descritas até o momento, todos pertencem a família Orthomyxoviridae: Influenza vírus A (IAV), Influenza vírus B (IBV), Influenza vírus C (ICV) e Influenza vírus D (IAV) (KRAMMER et al., 2018). A maior parte dos casos graves de gripe, epidemias sazonais e pandemias está relacionada ao IAV. Esta espécie é capaz de infectar todos os tipos de pessoas, mas tende a ser uma ameaça à vida de crianças, idosos e doentes crônicos. As aves aquáticas são o maior reservatório de IAV, mas o vírus também é encontrado em mamíferos terrestres e marinhos (LI et al., 2019; JOSEPH et al., 2017). Existem subtipos de IAV que são classificados de acordo com as proteínas virais hemaglutinina (H) e neuraminidase (N) (ASHA, 2019). Até hoje foram identificados 18 subtipos H e 11 N. Em humanos, apenas os subtipos H1-3 e N1-2 foram identificados. Atualmente, os subtipos de IAV em circulação são H1N1 e H3N2 (SAUTTO & KIRCHENBAUM, 2018).

As espécies IBV e ICV também são capazes de infectar humanos e animais, mas o ICV afeta principalmente crianças de forma assintomática e com sintomas leves (KRAMMER et al., 2018; GHEBREHEWET et al., 2016). Já o IDV é principalmente encontrado em suínos e bovinos, mas ainda não existem casos que comprovem que

este vírus cause doença em humanos (ASHA, 2019). Dentre as quatro espécies, os estudos que buscam fármacos antivirais e vacinas focam principalmente nos tipos IAV e IAB (ASHA, 2019).

Existem 3 principais formas de prevenção da gripe causada pelo vírus Influenza: vacinação, quimioprofilaxia antiviral e controle de infecção. Dentre estas medidas, a vacinação é a forma primária de proteção contra possíveis agravamentos da gripe (KRAMMER et al., 2018; DHARMAPALAN, 2020). As vacinas contra o vírus influenza são trivalentes ou quadrivalentes e podem ser compostas de vírus inativado ou atenuado. As vacinas da gripe conferem de 50 a 60% de proteção contra as cepas H1N1, H3N2 da espécie IAV e mais duas cepas de IBV (SAUTTO et al., 2018). Estes dados indicam a necessidade de estudos que busquem melhorar a resposta imune conferida pelas vacinas para que ocorra o aumento da imunidade contra cepas do vírus Influenza.

1.6. Resposta imune na infecção pelo vírus Influenza

Diferente do que é observado na tuberculose, a resposta imune contra o vírus influenza inicia-se de forma robusta no trato respiratório superior. Durante esta infecção, a resposta pro-inflamatória gerada pela imunidade inata serve como a primeira linha de defesa do hospedeiro. Na fase tardia da infecção, a imunidade adaptativa é crucial para conter a replicação viral e mediar a proteção contra reinfecções (WEI et al., 2014; CHEN et al., 2018).

Após a inalação, o vírus entra em contato inicialmente com as células epiteliais das vias aéreas superiores do hospedeiro. As células epiteliais respiratórias expressam constitutivamente em sua superfície glicoproteínas (MUC5AC, MUC5B e MIC1) que são ricas em ácido siálico (AS) (ROY et al., 2014; EHRE et al., 2012; MCAULEY et al., 2017). As proteínas virais H ligam-se ao SA e a outros receptores celulares, estabilizando o vírus na membrana celular (XU et al., 2010). A ligação do vírus Influenza na superfície celular induz endocitose dependente das proteínas claterina e clavinina (FONTANA et al., 2012). Após a endocitose, a liberação das partículas virais acontece de forma dependente da queda do pH endossomal que induz a abertura do canal de prótons M2, desencadeando a liberação do RNA viral (LAMB et al., 1996). O RNA viral migra para o núcleo da célula e interage com Importina- α/β , iniciando a replicação (SUN et al., 2013).

Os PRRs da imunidade inata fazem o reconhecimento inicial do vírus Influenza. Eles atuam no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e inicia a ativação da imunidade inata (CAO et al., 2016; OUYANG et al., 2014). Dentre os PRRs, o gene I induzível por ácido retinóico (RIG-I) é predominante no reconhecimento intracelular de ssRNA e leva à ativação de fatores de transcrição como IRF3 (Fator Regulador de Interferon 3), IRF7 e fator nuclear kappa B (NF- κ B) (PICHLMAIR et al., 2006; HISCOTT et al., 2006). Os TLRs endossomais TLR3, TLR7 e TLR8 também são PRRs críticos na resposta imune contra o vírus Influenza (TAKESHITA et al., 2006; GOUBAU et al., 2014). O reconhecimento via PRRs leva à ativação e translocação de fatores de transcrição e consequente transcrição de genes de IFNs do tipo I (IFN- α e IFN- β), IFNs do tipo III (IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3, IFN- λ 4) e citocinas (TNF, IL6, IL1 β , etc.) antivirais (SHAN et al., 2016). Apesar de terem função semelhante, os IFN- α/β e IFN- λ possuem algumas diferenças para conferir proteção durante a infecção. Camundongos infectados com Influenza foram tratados com IFN- α e apresentaram maior patologia pulmonar e mortalidade. Já o tratamento com IFN- λ conferiu proteção aos camundongos infectados (DAVIDSON et al., 2016; KIM et al., 2016).

A produção dos mediadores mencionados acima ativa as epiteliais respiratórias vizinhas não infectadas para resposta antiviral e recruta células inatas circulantes como: NKs, monócitos, neutrófilos e DCs (CHEN et al., 2018). As células NK atuam na vigilância imunológica e utilizam sua atividade citotóxica para eliminar as células infectadas pelo vírus (MENDELSON et al., 2010; GUO et al., 2011). Os macrófagos alveolares, monócitos e neutrófilos limitam a proliferação viral fagocitando as células infectadas (TUMPEY et al., 2005). As DCs internalizam e processam o vírus, enquanto migram para os linfonodos drenantes onde apresentam os peptídeos virais via MHC para as células T específicas, iniciando a resposta imune adaptativa (GEURTSVANKESSEL et al., 2008; HINTZEN et al., 2006).

A resposta imune de células T e B é crucial contra o vírus Influenza. As células T CD4⁺ e CD8⁺ desempenham papel fundamental produzindo mediadores antivirais, além de atuarem na morte de células infectadas (XIAOYONG et al., 2018). As DCs apresentam os peptídeos virais via MHC de classe I para as células T CD8⁺ naíves que se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs) (GEURTSVANKESSEL et al., 2008; KREIJTZ et al., 2011). Após a ativação e diferenciação, as células T CD8⁺ regulam positivamente a expressão de CXCR3 e CCR4 e migram para o pulmão

infectado (JENNRICH et al., 2012; XIAOYONG et al., 2018). No tecido infectado, essas células podem produzir citocinas como IFN- γ que contribuirá para ativação de macrófagos e para a produção de anticorpos IgG por células B (WHITMIRE et al., 2005). Outro mecanismo efetor é a citotoxicidade mediada por perforinas e granzimas que exige contato célula-célula e induz apoptose nas células infectadas (VAN DOMSELAAR & BOVENSCHEN, 2011). Alguns estudos também indicam que as granzimas atuam impedindo a replicação viral clivando proteínas virais (ANDRADE, 2010). As células T de memória também são essenciais na proteção contra reinfecções pelo vírus Influenza (CERWENKA et al., 1999). As células CD8⁺ TRMs são geradas na infecção e após a vacinação contra a gripe, gerando rápida proteção contra reinfecções (WAKIM et al., 2015). Neste contexto o reconhecimento de DAMPs como o eATP é um sinal necessário para a geração destas células em infecções virais (BORGES DA SILVA et al., 2020). As células CD8⁺ TRMs são encontradas no epitélio nasal após a infecção, onde restringem o acesso do vírus ao Sistema respiratório inferior, impedindo a disseminação viral para o pulmão (PIZZOLLA et al., 2017).

As células B não são meras coadjuvantes em resposta ao vírus Influenza. Estas células participam ativamente através da produção de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes (LOFANO et al., 2015). Nesta infecção a maior parte das células B responsivas são específicas para a proteína H do vírus (BARDELLI et al., 2013). Os anticorpos não neutralizantes correspondem à maior parte do pool de anticorpos produzidos e agem diretamente na lise de células infectadas por meio da citotoxicidade mediada por anticorpos (LOFANO et al., 2015). Os anticorpos do tipo IgA são indispensáveis para evitar a transmissão viral, mas os anticorpos IgG são mais abundantes e eficientes em controlar a infecção (SEIBERT et al., 2013). Até o momento, a resposta de células B de memória é a linha de defesa mais rápida utilizada pelo sistema imune após a vacinação contra a gripe (FRASCA et al., 2016).

Assim como na tuberculose, uma resposta inflamatória exacerbada durante a infecção pelo vírus Influenza pode lesionar o tecido pulmonar e comprometer a fisiologia respiratória. Alguns estudos já demonstraram que o acúmulo de células T CD8⁺ durante a infecção agrava a lesão pulmonar e aumenta a fibrose. As células T CD4⁺ são indispensáveis na imunidade antiviral e colaboram com as respostas de células T CD8⁺ e B, mas o infiltrado exacerbado e produção desregulada de citocinas como IFN- γ podem conduzir a doença pulmonar para um desfecho grave. As características da resposta de células T CD4⁺ serão detalhadas no tópico seguinte.

1.7. Resposta de células T CD4⁺ na infecção pelo vírus Influenza

A resposta efetora de células T CD4⁺ contra o vírus Influenza começou a ser estudada entre 1990 e 1995, utilizando modelos de depleção por anticorpos e camundongos deficientes de MHC de classe II (ALLAN et al., 1990; BODMER et al., 1993; TRIPP et al., 1995). Estes estudos demonstraram um papel secundário das células T CD4⁺ na infecção quando comparados às células T CD8⁺ e células B. Na ausência da resposta de células T CD4⁺, apenas um atraso no *clearance* viral foi observado (BODMER et al., 1993). Contudo, o requerimento da resposta destas células durante a infecção ficou mais evidente quando camundongos deficientes de células B foram tratados com anti-CD4 (MOZDZANOWSKA et al., 2000). Neste contexto, a resposta citotóxica das CTLs ficou comprometida e não foi capaz de controlar a infecção pela cepa A/Puerto Rico/8/34 (PR8). Estes dados demonstraram que as células T CD4⁺ são um importante pilar para sustentar a resposta de células T CD8⁺. Experimentos similares foram feitos, desta vez depletando células T CD8⁺ em camundongos deficientes de células B (MOZDZANOWSKA et al., 1997; TOPHAM & DOHERTY, 1998). Interessantemente, os camundongos sem resposta de células T CD8⁺ e B sucumbiram rapidamente. Portanto, a resposta de células T CD4⁺ sozinha não é capaz de controlar a infecção pelo vírus Influenza. É necessário que haja uma cooperação entre as respostas de células T e B para que haja sucesso no *clearance* viral (BROWN et al., 2004).

As células T CD4⁺ são capazes de reconhecer epítopos conservados de proteínas virais internas (DEVARAJAN et al., 2016; VALKENBURG et al., 2018). Elas são ativadas nos linfonodos drenantes pelas DCs que carregam os peptídeos virais (**Figura 8**) (ITANO & JENKINS, 2003). Após a ativação, a diferenciação para o perfil Th1 é predominante, mas também há envolvimento de células T CD4⁺ Th2, Tfh e Treg durante a infecção (GRUTA & TURNER, 2014; CHEN et al., 2018). As células Th1 migram para o tecido infectado, onde exercem sua função efetora produzindo citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2 que cooperam com a proliferação, ativação e diferenciação de células T CD8⁺. As células Th2 regulam a produção de anticorpos através da produção de IL-4 e IL-13 (LAMB et al., 1982). As células Treg contribuem na redução da resposta de células T CD8⁺ quando a infecção é controlada, prevenindo dano pulmonar por exacerbação da resposta inflamatória no tecido (JIANG et al., 2011). Contudo, este controle nem sempre é eficiente. As células Tfh são cruciais para

formação de centros germinativos nos linfonodos, direcionando a produção de anticorpos de alta afinidade contra o vírus Influenza (BENTEBIBEL et al., 2016).

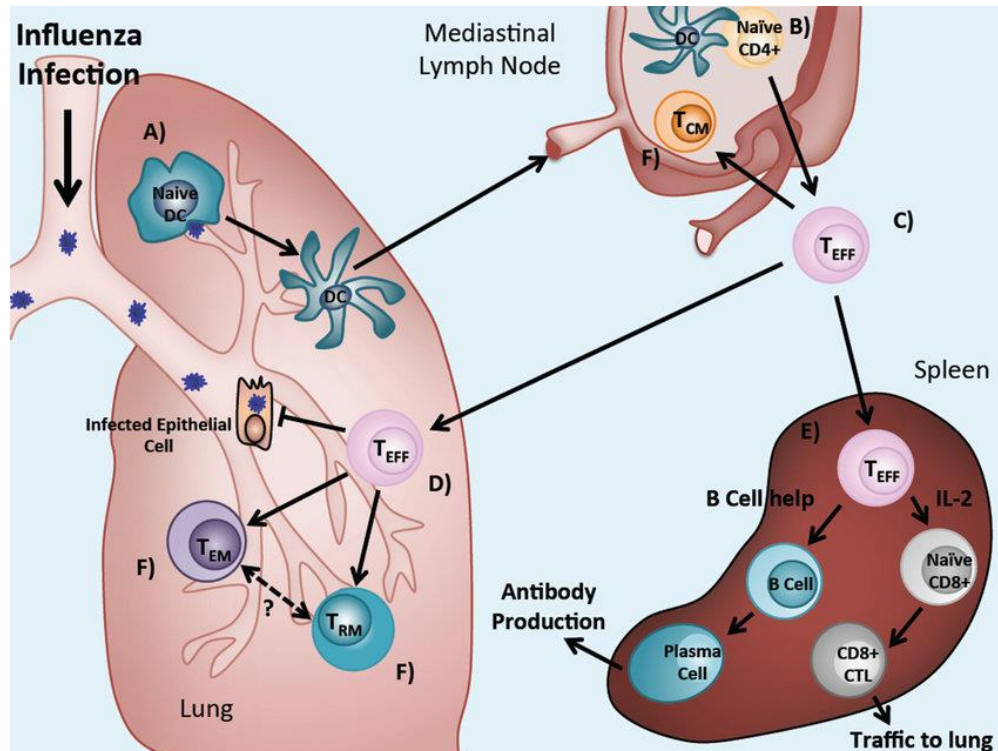


Figura 8: Resposta primária de células T CD4⁺ e geração de memória na infecção pelo vírus Influenza.

Fonte: Zens & Farber, 2014.

No pulmão infectado pela cepa PR8, dois novos subtipos de células T CD4⁺ residentes foram descritos recentemente (SWARNALEKHA et al., 2021). Estes subtipos são transcricionalmente semelhantes às células Th1 e Tfh. O surgimento destas células no pulmão ocorre de forma assíncrona. Na fase aguda da doença (7 dias p.i.), as células Th1 (PSGL-1^{hi}FR4⁻) são predominantes. Estas células Th1 contribuem para a resposta de células T CD8⁺ e B na fase aguda, como mencionado anteriormente (SCHREINER & KING, 2018). Na fase tardia, após a eliminação do vírus (14-30 dias p.i.), se observa o direcionamento das células Th1 para Trh (Célula T helper residente) (PSLG-1^{lo}FR4^{hi}). A geração de células Trh requer a interação com células B e é dependente da expressão de Bcl6. As células Trh podem ser vistas em pequenos aglomerados ao lado de células B no parênquima pulmonar. Estas células são cruciais para manter a produção de anticorpos durante uma reinfecção. Além disso, elas também contribuem para geração de células TRMs CD8⁺ (SON et al., 2021).

Na infecção pelo vírus Influenza, assim como na tuberculose, há a formação de iBALT (Tecido Linfóide Induzível Associado aos Bronquios) (SCHREINER & KING, 2018). Esses aglomerados linfóides não indispensáveis para a manutenção de células T CD4⁺ residentes no pulmão. Durante a infecção viral, as células T CD4⁺ também expressam altos níveis de CD69, CD103 e CXCR3 e migram para o parênquima pulmonar, onde exercem sua função de acordo com a fase da doença. No entanto, é a alta expressão CXCR3 que determina o acúmulo de células Th1 no parênquima pulmonar durante a infecção (DHUME et al., 2019).

As células T CD4⁺ realmente possuem papel secundário na proteção durante a infecção pelo vírus Influenza. Porém, assim como em outras infecções pulmonares, o acúmulo destas células somado a uma resposta efetora desregulada está associado ao agravamento do dano no tecido pulmonar e, conseqüente, à liberação de grandes quantidades de DAMPs (ZHAO et al., 2012). Este fato suporta a importância de estudos que busquem entender o que determina o acúmulo excessivo destas células no pulmão, visando melhorar o prognóstico da doença.

1.8. Efeitos do reconhecimento do ATP extracelular

A Adenosina Trifosfato (ATP) intracelular possui um importante papel como molécula energética nas reações celulares. Através das alterações metabólicas, as células podem regular a produção desta molécula (BURNSTOCK & VERKHRATSKY, 2009). Esses mecanismos são importantes para as funções vitais celulares como replicação e ativação. O ATP exerce papel crucial no meio intracelular e não está presente em altas concentrações no meio extracelular (LIPMANN, 2006). Baixos níveis de eATP exercem importantes funções fisiológicas, tais como agregação plaquetária, neurotransmissão (periférica e central), função cardíaca e contração muscular (DRURY & SZENT-GYÖRGYI, 1929). No entanto, o ATP pode ser liberado em altas concentrações no processo de morte celular. Células ativadas e apoptóticas utilizam a abertura de canais denominados panexina-1 para liberar ATP para o meio extracelular e isso pode levar a uma conseqüente ruptura da membrana plasmática (CHEKENI et al., 2010; ZEH & LOTZE, 2015).

O ATP pode ser liberado para o meio extracelular por vários tipos celulares assim como por exocitose em plaquetas e neurônios. No meio extracelular, o eATP pode ser reconhecido por receptores presentes na superfície celular ou ser

rapidamente hidrolisado em ADP, AMP e adenosina pela ectonucleotidases CD39 e CD73, respectivamente (**Figura 9**) (GORDON, 1986; YEGUTKIN, 2008; RIVAS-YÁÑEZ et al., 2020.).

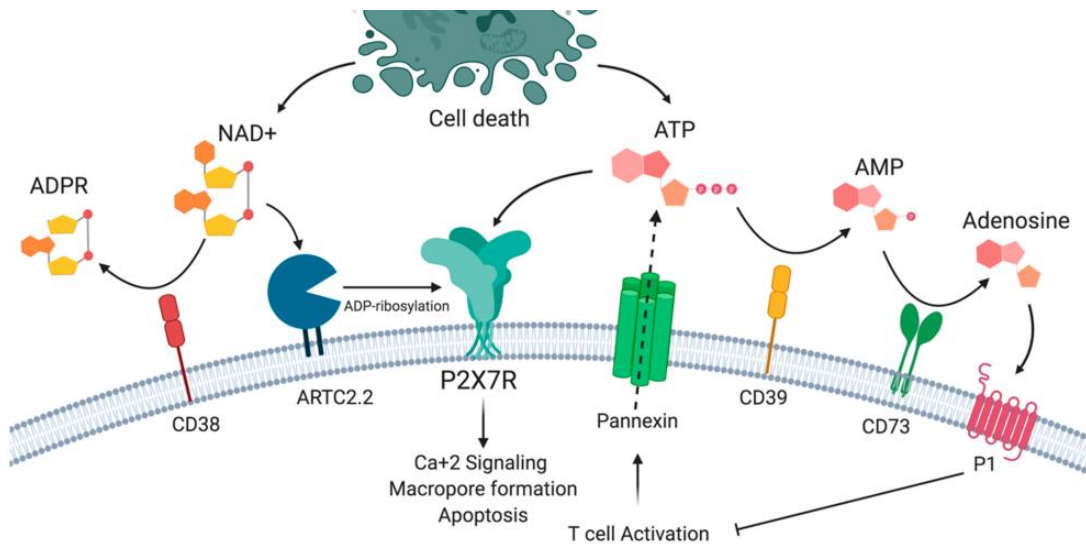


Figura 9: Reconhecimento e hidrólise do eATP.

Fonte: Rivas-Yáñez et al., 2020.

Dois grupos de receptores purinérgicos foram descritos, sendo eles, os receptores P1, que são capazes de reconhecer adenosina e os receptores P2 que reconheceriam o eATP. Dentre os receptores P2, duas famílias foram identificadas (BURNSTOCK, 1978; ABBRACCHIO & BURNSTOCK, 1994): o primeiro grupo é composto por receptores ou canais iônicos dependente de ligante, os quais são chamados de P2X. Já o grupo chamado de P2Y é composto de receptores que estão acoplados à proteína G (BURNSTOCK & KENNEDY, 1985).

Atualmente, são conhecidas oito isoformas na família P2RY em mamíferos (P2RY1, P2RY2, P2RY4, P2RY6, P2RY11, P2RY12, P2RY13 e P2RY14) e sete de P2RX (P2RX1-P2RX7) (ABBRACCHIO et al., 2009; BURNSTOCK, 2007; MILLER et al., 2011). Quanto à sua estrutura, os receptores da família P2RX possuem os dois domínios transmembrana (TM1 e TM2), além de um domínio extracelular responsável pela ligação com o ATP e uma porção n-terminal intracelular (BARRERA et al., 2005, DI VIRGILIO, 2015). A estrutura destes receptores está intimamente ligada à abertura de canais iônicos. A partir da abertura destes canais inicia-se um fluxo com entrada de Na^+ e Ca^{2+} e saída de K^+ e consequente despolarização da membrana plasmática. O influxo de cálcio está envolvido diretamente na sinalização celular (DI VIRGILIO, 2015, MILLER et al., 2011). Esta sinalização pode levar a vários caminhos, incluindo

a ativação, proliferação e morte celular, por exemplo (ADINOLFI et al., 2005). Diante desses fatos, nota-se que a família P2RX possui um papel significativo na resposta de células imunes.

Dentre todos os receptores P2RX, o mais estudado até o momento é o P2RX7. Em humanos o gene que codifica o receptor está localizado no cromossomo 12 e em camundongos no cromossomo 5. Este receptor é amplamente encontrado em tecidos como o cérebro, músculo, pele, intestino, células imunes, dentre outros (COLLO et al., 1997). No sistema imune, o P2RX7 é expresso por macrófagos, mastócitos, eosinófilos, DCs e linfócitos T (DI VIRGILIO et al., 2001). O P2RX7 especialmente é capaz de responder a altas concentrações de eATP e formar um poro permeável a moléculas de até 900Da (DI VIRGILIO et al., 2001). Este contexto é característico de dano celular e tecidual, quadro observado em respostas imunes muito exacerbadas.

Um dos limitantes para a determinação do papel do P2RX7 em células do sistema imune é a concentração de eATP disponível no microambiente. Baixas concentrações de eATP favorecem a ativação e proliferação de células via P2RX7 (RISSIEK et al., 2015). Em contraste, altas concentrações de eATP desencadeia a morte celular apoptótica ou necrótica em alguns tipos celulares (ADINOLFI et al., 2005; AMARAI et al., 2014). O tempo e intensidade do estímulo do P2RX7 também é limitante para determinar o papel do receptor. A estimulação prolongada de P2RX7 induz a formação de grandes poros na membrana plasmática (DI VIRGILIO, et al., 2001). Dependendo da intensidade e duração do estímulo, a predominância de cada uma dessas vias moleculares determina o gatilho para a morte celular por apoptose ou necrose. A ativação combinada de diferentes vias moleculares culmina em piroptose, pironecrose ou necroptose (BORTOLUCI & MEDZHITOV, 2010; KACZMAREK et al., 2013). A ativação celular via P2RX7 pode levar a um fenômeno de dano celular em cascata. Portanto, o reconhecimento de eATP pelo receptor P2RX7 contribui para o desenvolvimento e agravamento da inflamação estéril e infecciosa em diversos modelos (DI VIRGILIO, et al., 2017).

Além de seus efeitos fisiológicos, o P2RX7 também é um receptor muito relevante em doenças infecciosas (MILLER et al., 2011). Nos últimos tempos, este receptor tem sido amplamente estudado na interação patógeno-hospedeiro. Pesquisadores buscam não apenas entender o papel do receptor na inflamação proveniente de infecções, mas também como o P2RX7 contribui para a proteção ou

desenvolvimento de formas graves destas doenças infecciosas. (DI VIRGILIO et al., 2017).

Alguns estudos demonstraram que a sinalização via P2RX7 pode aumentar a resistência em casos de sepse (CSÓKA et al., 2015). Além disso, a expressão de P2RX7 em neutrófilos contribui para a eliminação de *Streptococcus pneumoniae*. (KARMAKAR et al., 2016). Quando se trata de infecções parasitárias, demonstrou-se que o P2RX7 participa da eliminação de parasitas intracelulares como *Leishmania* e *Toxoplasma* (COUTINHO-SILVA et al., 2003, COUTINHO-SILVA & OJCIUS, 2012). Na malária experimental, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o P2RX7 é crucial para a eliminação do patógeno (SALLES et al., 2014).

Em infecções virais, o eATP extracelular é essencial para promover imunidade antiviral robusta aumentando a produção de IFN- β e outros mediadores inflamatórios (ZHANG et al., 2017). Em alguns casos de infecções virais persistentes, a sinalização via P2RX7 pode gerar inflamação sistêmica e levar à morte. O bloqueio da interação P2RX7-eATP é eficiente no controle da inflamação pulmonar, reduzindo infiltrado de macrófagos, neutrófilos e produção de citocinas inflamatórias durante infecções por Influenza e adenovírus (LEYVA-GRADO et al., 2017; LEE et al., 2012).

Antigos trabalhos demonstram o papel do P2RX7 em infecções micobacterianas. Lammas et al., (1997), por exemplo, demonstrou que o tratamento de macrófagos humanos infectados com *M. bovis* BCG promoveu a morte destas células e consequentemente, a morte dos bacilos. Apesar disso, o papel do P2RX7 na tuberculose sempre foi dito como controverso. Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou que em infecções causadas por cepas micobacterianas hipervirulentas, o P2RX7 contribui para o desenvolvimento de formas graves da doença. Esse efeito hiperinflamatório não foi observado na infecção com cepas de baixa virulência como a *Mtb* H37Rv. Os resultados sugeriram a necessidade de uma alta resposta inflamatória, gerando elevada morte necrótica de macrófagos e liberação de eATP, o que só acontece na infecção pela cepa *Mtb* Beijing 1471 e principalmente pela cepa *Mbv* MP287, ambos isolados clínicos hipervirulentos (**Figura 10**) (AMARAL et al., 2014; EBERHARDT et al., 2022). Em 2017, ficou claro que a proteção conferida à camundongos deficientes de P2RX7 não é proveniente da ausência do receptor em células estruturais do pulmão, mas sim de células derivadas da medula óssea (BOMFIM et al., 2017). Contudo, o papel do receptor P2RX7 expresso

especificamente por células T CD4⁺ não estava elucidado na tuberculose pulmonar grave.

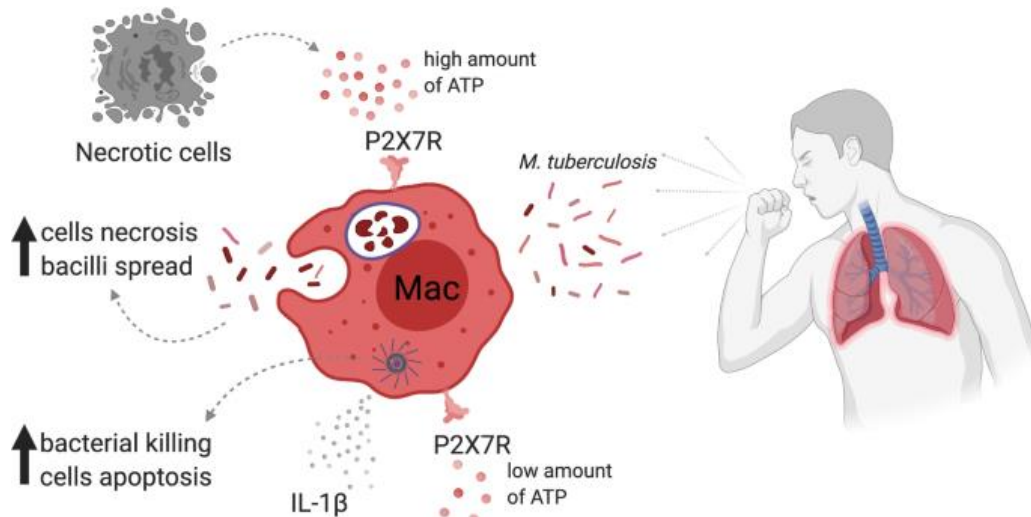


Figura 10: Papel dual do receptor P2RX7 na infecção por *Mtb*.
Fonte: Eberhardt et al., 2022.

1.9. Efeitos da sinalização via P2RX7 em células T CD4⁺

O papel da sinalização através do reconhecimento do eATP por P2RX7 em células T CD4⁺ ainda não totalmente esclarecido, mas se sabe que favorece a ativação celular durante a sinapse imunológica. A ativação antígeno-específica de células T via TCR e moléculas coestimuladoras induz a liberação de baixas concentrações de ATP pelos canais de panexina. O eATP liberado na sinapse é reconhecido pelos receptores P2RX1 e P2RX4 que são imediatamente recrutados para a sinapse (**Figura 11**). Já o P2RX7 permanece distribuído uniformemente pela membrana célula, podendo reconhecer o eATP de forma autócrina e parácrina. Este reconhecimento via receptores P2RX aumenta o influxo de Ca⁺ e ativa NFAT levando à produção de importantes mediadores, como IL-2 que aumenta a proliferação celular (RIVAS-YÁÑEZ et al., 2020; BURNSTOCK & BOEYNAEMS, 2014; JUNGER et al., 2011; YIP et al., 2009).

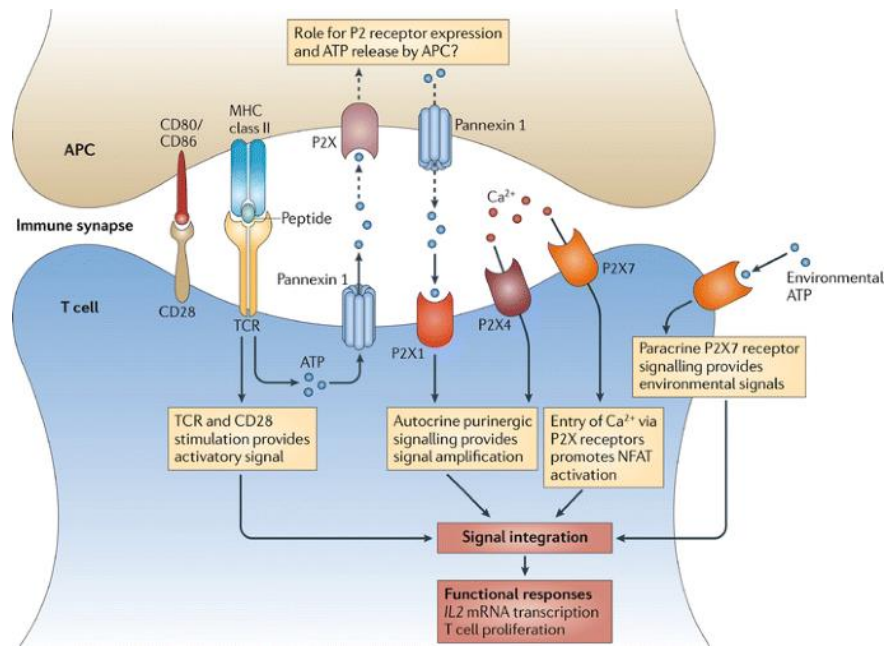


Figura 11: Efeitos da sinalização purinérgica na ativação de células T.

Fonte: Burnstock & Boeynaems, 2014.

O receptor P2RX7 também é um importante direcionador da diferenciação de células T CD4⁺. A deficiência de P2RX7 direciona a diferenciação de células T CD4⁺ para um perfil Th17 em camundongos com artrite induzida por colágeno (FAN et al., 2016). Essa diferenciação é mais evidente a partir de células T CD4⁺ regulatórias. Num ambiente rico em IL-6 e altos níveis de eATP, as células T CD4⁺FOXP3⁺ ficam prejudicadas em sua função supressora e diferenciam-se em células T CD4⁺ Th17 (SCHENK et al., 2011). Na malária experimental, a diferenciação de células Th1 CD4⁺ protetoras é favorecida pela sinalização via P2RX7 (SALLES et al., 2017). O direcionamento da diferenciação de células T provavelmente está relacionado com a programação metabólica celular induzida a partir interação eATP-P2RX7 (DI VIRGILIO et al., 2017).

O papel do eATP na migração de células da imunidade inata, como neutrófilos está bem descrito na literatura. Neste contexto, o reconhecimento do eATP é via receptor P2Y2 (JUNGER, 2008). Contudo, pouco se sabe sobre o envolvimento de altos níveis de eATP reconhecidos P2RX7 na migração e células T (Mishra et al., 2016; DI VIRGILIO et al., 2017). Até o momento, o que se sabe é que o P2RX7 é fundamental para a saída de células do linfonodo em direção aos tecidos. A Sinalização via P2RX7 induz o *shedding* L-selectina (CD62L) através da atividade das metaloproteases ADAM10 e ADAM17 (LE GALL et al., 2009). Portanto, a deficiência de P2RX7 pode gerar retenção de células T nos linfonodos. Adicionalmente, novos

estudos comprovam a ação do receptor P2RX7 na motilidade das células durante o processo de ativação. A sinalização via P2RX7 induz ondas de Ca^+ que agem de forma parácrina nas células T vizinhas, reduzindo sua motilidade e melhorando a interação com as DCs (WANG et al., 2014).

Por fim, mas não menos importante, o receptor P2RX7 pode agir na morte de células T durante processos inflamatórios e de dano tecidual. Esse processo é dependente do tempo de exposição, níveis de eATP e expressão de ectonucleotidases (RIVAS-YÁÑEZ et al., 2020). Um tipo de morte celular regulado pelo receptor P2RX7 é a apoptose. Este processo utiliza não apenas o eATP, mas também baixas concentrações de NAD^+ que serve como substrato para ARTC2.2 catalisar a ribosilação de ADP do P2RX7 em camundongos, levando à imediata ativação e consequente morte celular induzida por NAD^+ (SEMAN et al., 2003). Esta morte por ocorrer pela abertura de poros não seletivos na membrana celular ou via fosforilação da proteína quinase $\frac{1}{2}$ (ERK1/2) (AMSTRUP et al., 2003). A abertura de poros não seletivos pode também levar a morte celular por necrose, devido a entrada e saída desregulada de íons e outras moléculas (TAYLOR et al., 2008). Como mencionado anteriormente, em condições de liberação de altos níveis de ATP, alguns subtipos de células T CD4^+ podem escapar da morte celular induzida por P2RX7 expressando CD39 e CD73. Desta forma, o eATP é hidrolisado antes de se ligar ao P2RX7. Células T CD4^+ regulatórias utilizam este mecanismo para escapar da morte em condições inflamatórias graves (DEAGLIO et al., 2007; VIGNALI et al., 2008).

De fato, a expressão de P2RX7 e a sinalização gerada a partir do reconhecimento de altos níveis de eATP pode direcionar o destino de células T CD4^+ em diferentes modelos. Contudo, ainda não é claro os efeitos do P2RX7 expresso por células T CD4^+ durante infecções pulmonares graves como tuberculose e Influenza, onde há grande liberação de eATP.

2 Objetivos

2.1. Geral

O objetivo principal deste trabalho foi compreender o papel das células T CD4⁺ residentes, particularmente da sinalização através do P2RX7, na geração de lesões pulmonares decorrentes de infecções e os mecanismos envolvidos nesse processo.

2.2. Específicos

- Identificar o papel das células T CD4⁺ residentes efetoras no agravamento da tuberculose pulmonar induzida por cepa hipervirulenta;
- Compreender o papel do receptor P2RX7 na residência de células T CD4⁺ efetoras na tuberculose pulmonar grave;
- Investigar como a expressão de P2RX7 em células T determina o desfecho da tuberculose pulmonar grave;
- Avaliar o papel do receptor P2RX7 na inflamação pulmonar causada pelo vírus Influenza;
- Averiguar se os mecanismos que envolvem a sinalização via P2RX7 e a residência de células T CD4⁺ estendem-se para outras infecções pulmonares, como pelo vírus Influenza.

3 Metodologia

3.1. Animais

Camundongos das linhagens C57BL/6 (CD45.1 e CD45.2), *Cd4^{-/-}*, *P2rx7^{-/-}*, *P2rx7^{fl/fl}*, *Cd4cre*, *CD4creP2rx7^{fl/fl}*, *CMVcre*, *CMVcrePanx1^{fl/fl}* e *Cd4crePanx1^{fl/fl}* livres de patógenos específicos (SPF) de 6-8 foram utilizados neste projeto. Camundongos machos foram usados para experimentos de tuberculose grave e camundongos fêmeas para experimentos com o vírus Influenza. Os animais foram mantidos em microisoladores nas instalações de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) (São Paulo, Brasil), do Centro de Bociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) (Rio de Janeiro, Brasil) ou do departamento de Imunologia da Mayo Clinic (Arizona, EUA) até o momento da experimentação. Para iniciar os experimentos, os camundongos destinados a experimentos com modelo de tuberculose grave foram transportados para o laboratório de Biossegurança Nível 3 (NB-3) do Instituto de Ciências Farmacêuticas da USP ou do Laboratório de Biologia de Reconhecimento da UENF, onde todos os experimentos com a cepa *Mbv* MP287 foram executados. Os camundongos infectados com a cepa PR8 do vírus Influenza foram mantidos no laboratório de Biossegurança Nível 2 (NB-2) da Mayo Clinic (Arizona, EUA). Em todos os experimentos, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê institucional de cuidado e uso de animais das instituições envolvidas no trabalho (CEUA 5611150818, CEUA 402/2021 e IACUC A00005542-20).

3.2. *Mycobacterium bovis*

O isolado clínico hipervirulento *Mbv* MP287/03 foi cedido pelo Dr. José Soares Ferreira Neto (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo). A cepa foi congelada em meio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, EUA) suplementado com ADC (albumina, dextrose e catalase) (Difco, EUA) e mantida em freezer -80°C até da experimentação. O monitoramento do crescimento micobacteriano foi realizado medindo-se a Densidade Óptica (D.O. 600nm) por espectrofotometria (Biochrom, modelo Libra S6). Para a realização dos experimentos, a cepa micobacteriana foi descongelada e adicionada ao meio Middlebrook 7H9

suplementado com 10% ADC. A cultura em suspensão micobacteriana foi agitada em vórtex (Biomatic, Brasil) e sonicada em banho de ultrassom (Ultrasonic Maxi cleaner 800 – Unique, Brasil) por 1 minuto para dispersar os grumos. A cultura foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 5-7 dias. Após este período a cepa atinge a D.O. suficiente para a experimentação.

3.3. Vírus influenza

A cepa A/Puerto Rico/8/34 (PR8) do vírus Influenza foi gentilmente cedida pelo Dr. Jie Sun da Universidade da Virgínia. Dr. Sun enviou alíquotas contendo $\sim 1,1 \times 10^9$ PFU, que foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da infecção. No momento da experimentação o estoque viral passou por diluições seriadas para preparação do inóculo de ~ 1400 PFU.

3.4. Infecção dos camundongos

As infecções com a cepa *Mbv* MP287 foram realizadas por via intratraqueal (i.t.). Uma incisão cirúrgica foi realizada para expor a traqueia dos camundongos, onde foi injetado 90 μ L de inóculo contendo $\sim 10^2$ CFU diluído em PBS. Antes da cirurgia os camundongos foram anestesiados com uma solução de cetamina (110 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), sendo inoculados de 80 a 100 μ L (dependendo do peso e sexo dos animais) de anestésico por via intraperitoneal. Após o procedimento cirúrgico os animais foram suturados e mantidos aquecidos até se recuperarem da anestesia. Para infecções com a cepa viral PR8, os camundongos foram anestesiados com isoflurano e 20 μ L de inóculo viral (~ 1400 PFU) diluído em PBS foi injetado por via intranasal.

3.5. Depleção de células T CD4⁺

Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa *Mbv* MP287 e no dia 21 p.i. receberam uma única injeção i.p. de anticorpo purificado GK 1.5 anti- α -CD4 (250 μ g) (Bio X Cell). Este dia foi escolhido para o tratamento, pois é quando se inicia o agravamento da doença nos camundongos. No dia 28 p.i., os camundongos foram eutanasiados e a depleção foi verificada no pulmão por citometria de fluxo (**Apêndice A**).

3.6. Purificação de células T CD4⁺ e transferência adotiva

As células T CD4⁺ esplênicas foram isoladas de camundongos WT e *P2rx7^{-/-}* por seleção negativa usando o Kit de Isolamento de Células T CD4⁺ EasySep™ Mouse (STEMCELL), seguindo o protocolo do fabricante. Após o isolamento, obtivemos ~94% de pureza (**Apêndice A**). Em seguida, as células T CD4⁺ foram transferidas (1x10⁶ ou 3x10⁶ por camundongo) por via i.v. para camundongos *Cd4^{-/-}* 5 dias após a infecção com a cepa *Mbv* MP287.

3.7. Marcação intravascular

Para marcação das células intravasculares, os camundongos foram anestesiados com isoflurano e receberam injeção intravenosa (i.v.) de 2,5 µg de um anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD45 (30-F11) marcado com fluoróforo (BioLegend). Após 3 minutos, os camundongos foram eutanasiados para coleta do pulmão e linfonodo mediastinal (mLN) (Anderson et al., 2014).

3.8. Processamento pulmonar e preparação das células

O pulmão foi coletado e os lóbulos processados e digeridos com colagenase tipo IV (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) a 37° C por 40 minutos sob agitação (200 rpm) (Amaral et al., 2019). A suspensão de células obtida foi homogeneizada e filtrada através de filtros de células (Corning) e incubada com ACK Lysing Buffer (Thermo Fisher Scientific) à temperatura ambiente durante um minuto para lisar os eritrócitos. Após 2 minutos, a suspensão de células pulmonares foi lavada com PBS 10% de soro fetal de vitela (Gibco, US) para bloquear a ação do ACK. A suspensão celular foi centrifugada a 1.200 rpm por 5 minutos e ressuspensa em meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e 0,1% de gentamicina (Gibco, EUA). Em seguida, os números de células pulmonares viáveis foram determinados usando ensaio de exclusão com *trypan Blue*.

3.9. Análises por citometria de fluxo

Células T foram isoladas do pulmão por digestão tecidual com colagenase IV (0,5 mg/mL) e do mLN por digestão mecânica. Nos experimentos de cotransferência adotiva usando modelo de tuberculose grave e em todos os experimentos com vírus Influenza, 50 µg de nano anticorpo Treg-Protector (anti-ARTC2.2) (BioLegend) foram injetados i.v. 30 minutos antes da eutanásia dos animais (Borges da Silva et al., 2019). As células do pulmão e mLN foram marcadas usando anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, sendo eles: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45, anti-CD45.1, anti-CD45.2, anti-CD44, anti-CD69, anti-KLRG1, anti-CX3CR1, anti-CXCR3, anti-IFN-γ, anti-P2RX7, anti-Ki-67 e anti-T-bet (BD Biosciences). Para marcação intracelular *ex vivo* de IFN-γ, as células pulmonares foram incubadas com monensina (2 µM) por 4 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%, fixadas e permeabilizadas com kit BD cytofix/cytoperm (BD Biosciences) (Amaral et al., 2019). O corante *Live/Dead* foi usado para corar as células mortas. As células foram adquiridas usando citômetro de fluxo LSRFortessa™ ou FACSyphony™ A5 (BD Biosciences). A distribuição convencional e por tSNE (*t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*) foram realizadas usando o software FlowJo (BD Biosciences) (Bomfim et al., 2021).

3.10. Análise histológica

O lobo superior direito do pulmão foi coletado, lavado em PBS e mantido em paraformaldeído 10% por 24 horas. Após este período o tecido foi fotografado para análise macroscópica. Posteriormente, cortes histológicos de aproximadamente 4-5 µm foram corados com Hematoxilina-eosina (HE) ou Tricrômio de Masson (MT) para visualização microscópica e posteriormente fotografados.

3.11. Quantificação do CFU

A suspensão pulmonar foi submetida a diluição seriada em PBS e logo após foi semeada em placas de Petri contendo meio Middlebrook 7H10 Agar (Becton Dickinson, EUA) suplementado com 10% de OADC (oleato, albumina, dextrose e catalase) (Difco, EUA). As placas foram seladas e mantidas em estufa a 37° C e 5%

CO₂ por 21 dias. Após esse período, as colônias foram contadas para determinação da carga micobacteriana pulmonar.

3.12. Quantificação da carga viral

As cargas virais nos experimentos com a cepa PR8 foram definidas por PCR quantitativa (qPCR), comparando a amplificação de amostras de sobrenadante pulmonar com a amplificação de cDNA viral de uma amostra de concentração conhecida de PFU (método da curva padrão). Os primers utilizados para amplificação do cDNA do vírus foram: PR8-NP, 5'-GATTGGTGAATTGGACGAT-3' and 5'-AGAGCACCATTCTCTATT-3'.

3.13. Microscopia confocal

Cortes parafinados de aproximadamente 10 µm foram feitos com o lobo superior direito do pulmão. Após a desparafinação, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica com PBS 1x, tripsina (0,1%) e EDTA (1mM). Subsequentemente, as seções foram bloqueadas com 2% de BSA em PBS por 30 min e depois incubadas *overnight* à 4°C com anticorpo anti-S100A9 primário. Após 24 horas, os cortes foram corados com anticorpo anti-CD4 e anti-IFN-γ (BD Biosciences) conjugado com fluorocromos PE e APC, respectivamente. As lâminas foram tratadas com o reagente *Sudan Black B* (Sigma-Aldrich) para remover a autofluorescência natural do tecido. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e cobertas com o reagente antifade ProLong Gold (Invitrogen). Depois de marcadas e tratadas, as lâminas foram lavadas e as lamínulas foram inseridas. O microscópio confocal SP5 de alta resolução (Leica) foi utilizado para visualização das lâminas e análise das imagens realizadas no software Fiji.

3.14. Geração de quimeras mistas de medula óssea

Camundongos C57BL/6 (CD45.2) foram irradiados com 1000 rads no biotério do Hospital Mayo Clinic (Scottsdale, Arizona) e reconstituídos com a mistura 1:1 de célula da medula óssea de camundongos *Cd4cre* (CD45.2) e *Cd4creP2rx^{fl/fl}* (CD45.1/2). Os camundongos receberam antibiótico na água por 3 semanas após a

transferência. A reconstituição foi seguida semanalmente por citometria de fluxo e os camundongos foram infectados pelo vírus Influenza após aproximadamente 1-2 meses.

3.15. Análises por RNA-sequencing

Camundongos *Cd4cre* e *Cd4reP2rx7^{fl/fl}* foram infectados com a cepa PR8. No dia 7 p.i., as células T CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ e CD45iv⁻CD44⁺CD4⁺ dos pulmões foram isoladas (BD FACSAria III Cell Sorter). O RNA foi extraído usando o RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN). A preparação da biblioteca e RNA-seq (plataforma DNBseq, PE 100bp par-end read length) foi feita pela BGI Americas. As leituras de RNA-seq foram mapeadas e a matriz de contagem bruta foi gerada. A análise DEG foi feita usando DESeq2, e genes com alterações >2 vezes e FDR <0,05 foram considerados para análise de agrupamento de genes. Heatmaps, gráficos de PCA e análises de enriquecimento de vias foram gerados usando R-based BGI Dr. Tom online analysis toolkit (<https://www.bgi.com/global/dr-tom/>).

3.16. Análises estatísticas

Detalhes das análises estatísticas utilizadas para cada experimento podem ser encontrados nas legendas das figuras. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 9. Os dados foram descritos como média com barras de erro indicando o SEM. O teste T foi usado para avaliar as diferenças entre apenas dois grupos. O teste one-way ANOVA e o teste post hoc de Tukey foram usados para avaliar os efeitos de apenas 1 parâmetro entre mais de 2 grupos. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (**).

4 Resultados

Capítulo 1

Papel do receptor P2RX7 em células T CD4⁺ na tuberculose pulmonar grave

4.1. Células T CD4⁺ residentes efectoras agravam a tuberculose pulmonar

Inicialmente, induzimos um quadro de tuberculose pulmonar grave em camundongos C57BL/6 (WT) através da infecção intratraqueal com a cepa micobacteriana hipervirulenta *Mbv* MP287 (SANTIAGO-CARVALHO et al., 2021). A infecção por MP287 é capaz de induzir lesões pulmonares graves, associadas a intenso infiltrado inflamatório (#) e extensas áreas de necrose pulmonar (*) aos 28 dias p.i. (**Figura 12A**). Este fenômeno não é observado em infecções por cepas de baixa virulência como *Mtb* H37Rv (RIBEIRO et al., 2014; AMARAL et al., 2014). Por isso, a infecção por MP287 é o modelo ideal para avaliar as consequências da grande liberação de DAMPs devido à intensa morte celular no desenvolvimento da tuberculose (AMARAL et al., 2014).

Em seguida, acessamos o infiltrado intravascular e parenquimatoso de células T CD4⁺ no pulmão usando marcação intravenosa com anticorpos anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia dos camundongos (Anderson et al., 2014). Neste contexto, notamos que 28 dias p.i. há um número maior de células T CD4⁺ residentes no parênquima pulmonar (CD45iv⁻) do que na vasculatura (CD45iv⁺) (**Figura 12B e Apêndice A**). Este resultado contrasta os observados em infecções pela cepa H37Rv, que possui mais células T CD4⁺ infiltradas na vasculatura e baixos números no parênquima pulmonar (SAKAI et al., 2014). Nossos dados indicam que o intenso infiltrado de células T CD4⁺ residentes poderia contribuir para o agravamento das lesões pulmonares durante a infecção pela cepa MP287.

A fim de avaliar o fenótipo das células T CD4⁺ no tecido pulmonar, nós utilizamos marcadores característicos de células T CD4⁺ intravasculares e parenquimatosas (Sakai et al., 2014). A análise por tSNE (*t-distributed stochastic neighbor embedding*) de células T CD4⁺ experimentadas evidenciou os compartimentos intravascular (CD45iv⁺CX3CR1⁺) e parenquimatosos (CD45iv⁻CXCR3⁺) em camundongos WT infectados (**Figura 12C**). Adicionalmente, observamos que as células T CD4⁺ do parênquima expressaram níveis mais elevados

do marcador de ativação e *homing* CD69. Já o marcador de células efetoras terminais, KLRG1, que antes foi descrito como expresso principalmente em células T CD4⁺ intravasculares (Sakai et al., 2014), aqui é expresso em ambas as populações.

Como mencionado anteriormente, a expressão do receptor P2RX7 é constantemente associada à manutenção do *homing* de células T em tecidos não linfoides (BORGES DA SILVA et al., 2020). Além disso, a expressão deste receptor é aumentada em células imunes em casos de dano tecidual grave em que grandes quantidades de eATP são liberadas (RYAN et al., 1991). Portanto, avaliamos a expressão de P2RX7 em células T CD4⁺ intravasculares e parenquimatosas 28 dias p.i. em camundongos infectados com MP287. Notavelmente, o receptor P2RX7 foi altamente expresso em células T CD45^{iv-}CD44⁺CD4⁺ de camundongos infectados em comparação com células T CD45^{iv+}CD44⁺CD4⁺ (**Figura 12D**). Esse resultado indica que o receptor P2RX7 pode ser importante para o estabelecimento das células T CD4⁺ efetoras no parênquima pulmonar.

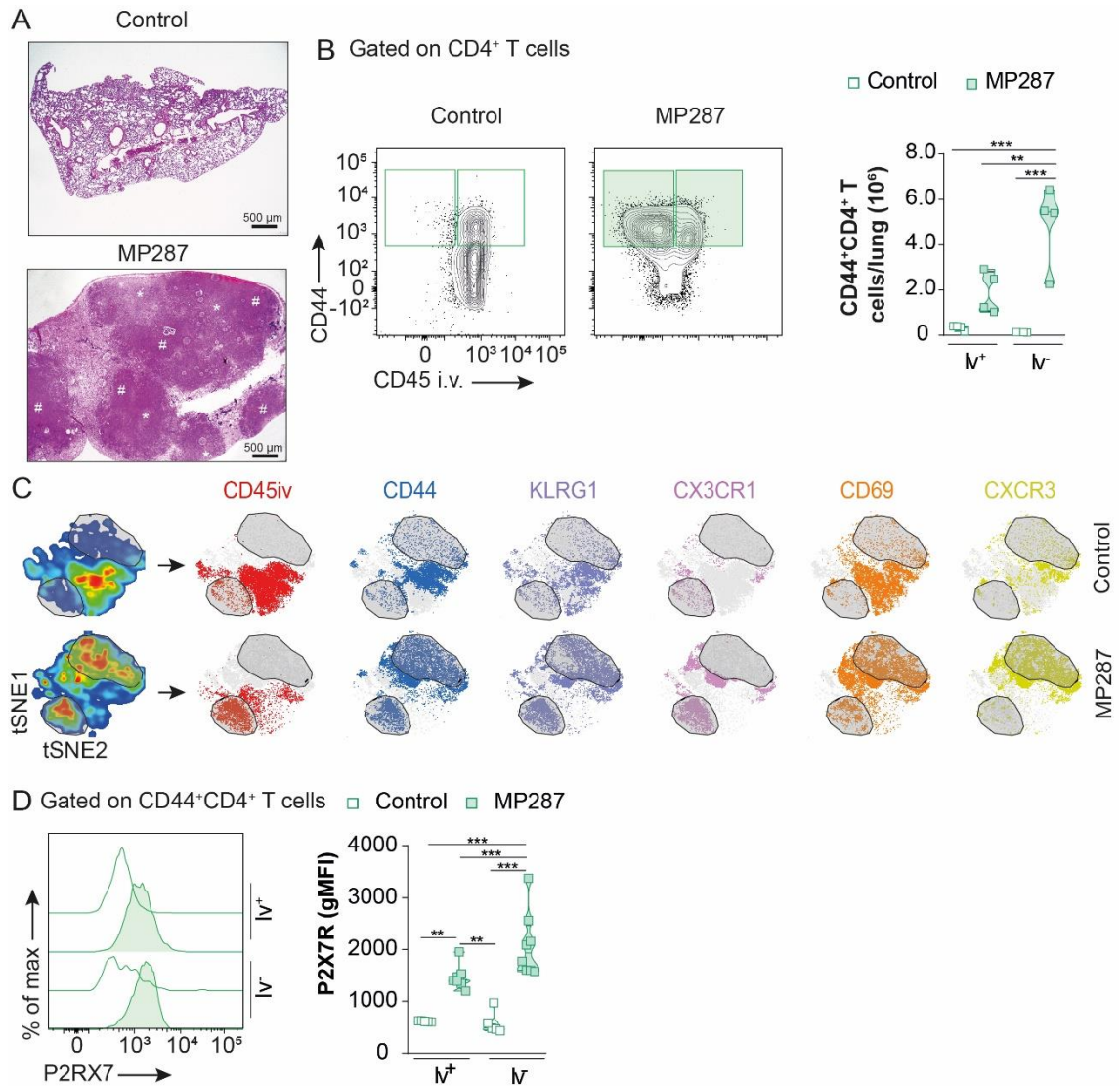


Figura 12: Infiltrado e fenótipo de células T CD4⁺ no pulmão durante a tuberculose grave causada pela cepa *Mbv* MP287. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ~100 bacilos da cepa hipervirulenta *Mbv* MP287. Camundongos não infectados foram usados como controles. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) As imagens mostram cortes representativos do pulmão infectado e controle coradas com HE (500 μ m). (*) indicam áreas de necrose e (#) indicam os sítios inflamatórios. (B) Expressão de CD44 e CD45 i.v. em células T CD4⁺. (C) O gráfico de distribuição espacial em tSNE (*t-distributed stochastic neighbor embedding*) mostra a expressão de CD45 i.v., CD44, KLRG1, CX3CR1, CD69 e CXCR3 em células T CD4⁺. (D) Expressão do receptor P2RX7 em células T CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ e CD45iv⁻CD44⁺CD4⁺. O gráfico *violin* mostra a Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência (gMFI) de P2RX7. Os dados são de 2–3 experimentos independentes; n = 3–5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média \pm SEM. Os valores de p dos testes One-way ANOVA e post hoc de Tukey são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Para avaliar se a intensa infiltração de células T CD4⁺ residentes contribui para o agravamento da tuberculose, depletamos as células T CD4⁺ com apenas uma alta dose de anticorpo anti- α -CD4 no dia 21 p.i. (**Figura 13A e Apêndice B**). Este é o momento em que o agravamento da doença começa em camundongos infectados com a cepa MP287 (Bomfim et al., 2021). Como esperado, camundongos WT infectados (IgG) começam a perder peso 21 dias p.i. (**Figura 13B**). Em contraste, os camundongos tratados com anticorpo α -CD4 recuperam o peso após a depleção de células T CD4⁺. Apesar disso, a depleção de células T CD4⁺ não contribuiu para a redução da carga bacteriana pulmonar (**Figura 13C**). Adicionalmente, o peso do pulmão e o número total de células estão reduzidos em camundongos depletados desta população (**Apêndice B**). Camundongos infectados do grupo controle (IgG) apresentam aumento do tamanho do lobo superior direito do pulmão e presença de múltiplos nódulos, indicando tuberculose grave (**Apêndice B**). A histologia pulmonar em hematoxilina-eosina (HE) revela que há uma redução significativa nas áreas de inflamação (#) e necrose (*) após a depleção de células T CD4⁺ (**Figura 13G**).

Para confirmar se o número de células T CD4⁺ infiltradas no pulmão durante a infecção por MP287 determina a melhora ou piora da tuberculose em camundongos, o modelo de transferência adotiva de altos (3×10^6) e intermediários (1×10^6) números de células T CD4⁺ 5 dias p.i. para camundongos *Cd4^{-/-}* (**Figura 13E e Apêndice B**). Como resultado, os camundongos que receberam um número maior de células T CD4⁺ perderam mais peso corporal do que os camundongos que receberam um número menor dessas células (**Figura 13F**). O CFU, peso pulmonar e infiltrado celular estão mais aumentados em camundongos transferidos com 3×10^6 do que em camundongos que receberam 1×10^6 células T CD4⁺ (**Figura 13G e Apêndice B**).

Juntos, estes resultados sugerem que na fase de agravamento da tuberculose, as células T CD4⁺ efetoras que residem no parênquima pulmonar contribuem para o agravamento da tuberculose pulmonar causada por micobactérias hipervirulentas.

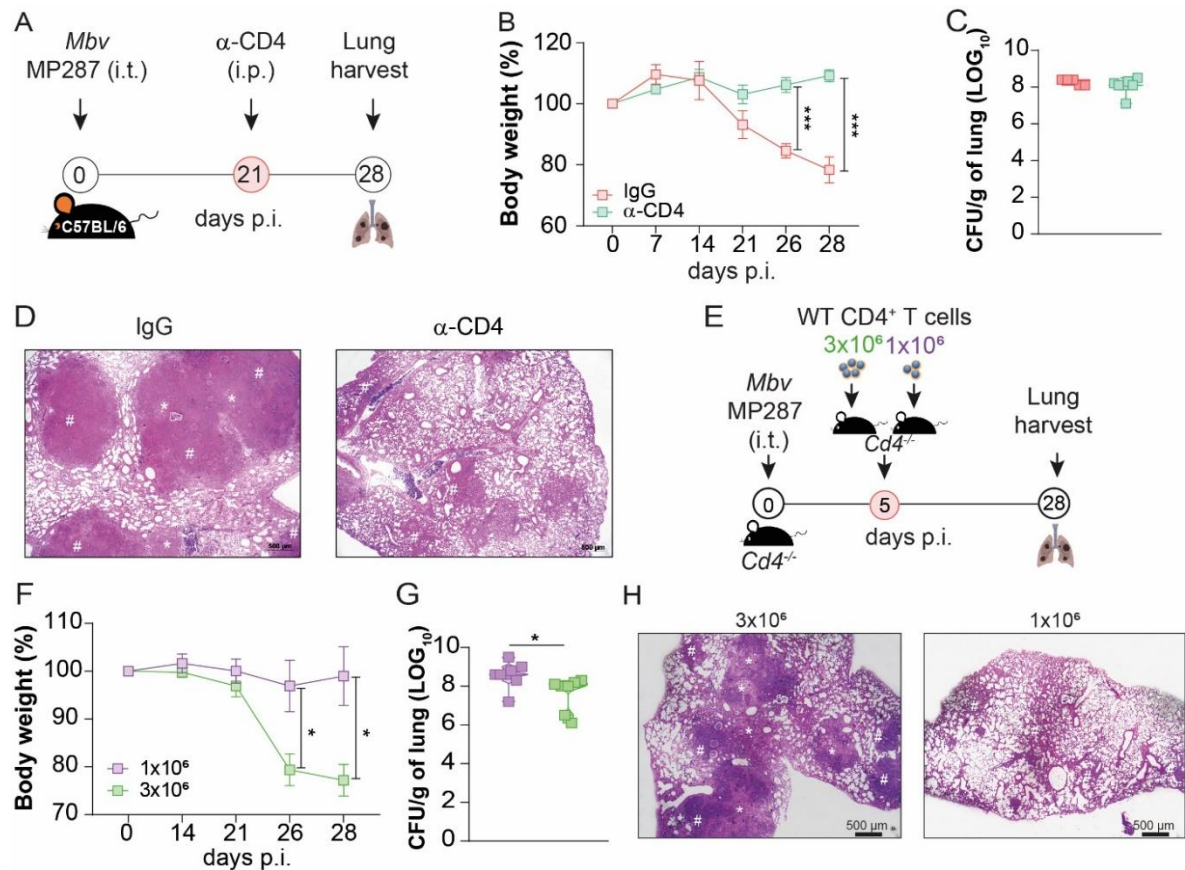


Figura 13: Efeitos das células T CD4⁺ residentes na gravidade da tuberculose pulmonar causada pela cepa *Mbv* MP287. Camundongos C57BL/6 e *Cd4*^{-/-} foram infectados com ~100 bacilos da cepa hipervirulenta *Mbv* MP287. Camundongos não infectados foram usados como controles. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) Ilustração esquemática do protocolo experimental. No dia 21 p.i., camundongos C57BL/6 infectados foram tratados com anticorpo α -CD4 (250 μ g) ou IgG2b (controle isotópico). (B) Percentual de peso corporal em relação ao dia 0 de infecção. (C) CFU por grama de pulmão. (D) Cortes histológicos representativos dos pulmões infectados corados com o HE (500 μ m). (*) indicam áreas de necrose e (#) indicam os sítios inflamatórios. (E) Ilustração esquemática do protocolo experimental. No dia 5 p.i. Camundongos *Cd4*^{-/-} receberam células T CD4⁺ esplênicas (1x10⁶ ou 3x10⁶) de camundongos WT. (F) Porcentagens de peso corporal em relação ao dia 0. (G) CFU por grama de pulmão. (H) Cortes histológicos representativos dos pulmões infectados corados com o HE (500 μ m). (*) indicam áreas de necrose e (#) indicam os sítios inflamatórios. Os dados são de 2–3 experimentos independentes; n = 3–5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média \pm SEM. Os valores de p dos testes One-way ANOVA e post hoc de Tukey são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

4.2. A deficiência de P2RX7 reduz a população de células T CD4⁺ residentes e previne a geração de formas graves de tuberculose pulmonar

Para avaliar se o receptor P2RX7 aumenta a residência de células T CD4⁺ efectoras, contribuindo para o agravamento da tuberculose, infectamos camundongos WT e *P2rx7^{-/-}* com a cepa MP287. Confirmando estudos anteriores do nosso grupo, os dados demonstram que a sinalização via P2RX7 contribui para o desenvolvimento de formas agressivas de tuberculose (AMARAL et al., 2014; BOMFIM et al., 2017). Camundongos *P2rx7^{-/-}* foram mais resistentes à infecção pela cepa MP287 do que camundongos WT (**Figura 14A**). Observamos que os camundongos *P2rx7^{-/-}* têm pulmões mais leves e menor carga bacteriana 28 dias p.i. do que camundongos WT (**Figura 14B-C**). As imagens histológicas confirmam a proteção, sendo possível observar menor infiltrado inflamatório (#) e áreas de necrose (*) em camundongos *P2rx7^{-/-}* do que em camundongos WT (**Figura 14D**). Adicionalmente, a população de células T CD44⁺CD4⁺ residentes do parênquima pulmonar foi reduzida em camundongos *P2rx7^{-/-}* infectados, enquanto números semelhantes foram observados na vasculatura (**Figura 14E**). O bloqueio farmacológico tardio do receptor P2RX7 com o antagonista *Brilliant blue G (BBG)* teve o mesmo efeito observado em camundongos *P2rx7^{-/-}* (SANTIAGO-CARVALHO et al., 2021) (**Apêndice C**).

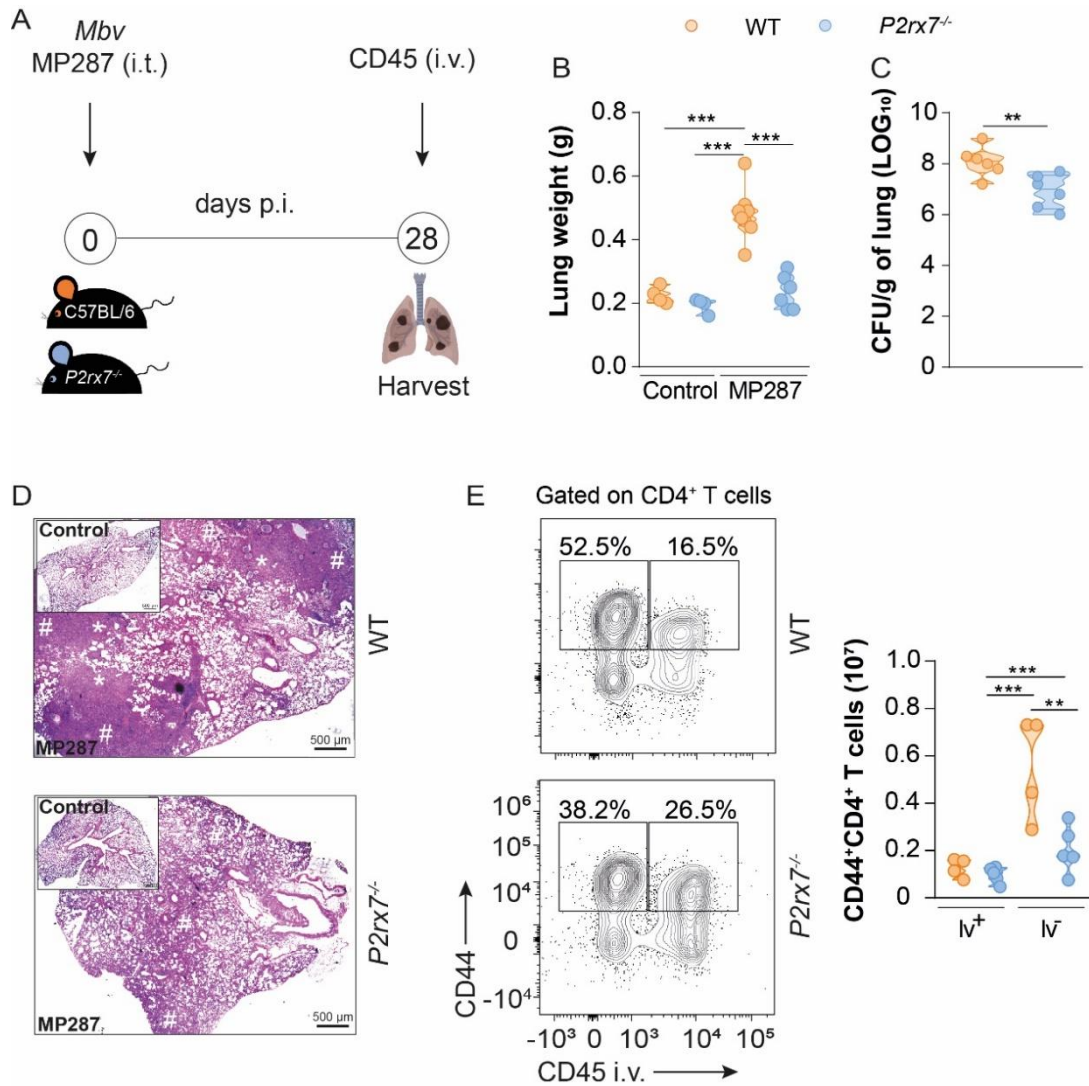


Figura 14: Efeitos da sinalização via P2RX7 na residência de células T CD4⁺ e no agravamento da tuberculose pulmonar causada pela cepa *Mbv* MP287. Camundongos C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} foram infectados com ~100 bacilos da cepa hipervirulenta *Mbv* MP287. Camundongos não infectados foram usados como controles. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) Ilustração esquemática do protocolo experimental. (B) Peso do pulmão total em gramas. (C) CFU por grama de pulmão. (D) Cortes histológicos representativos dos pulmões infectados corados com o HE (500 μm). (*) indicam áreas de necrose e (#) indicam os sítios inflamatórios. (E) Expressão de CD44 e CD45 i.v. em células T CD4⁺. Os dados são de 2 experimentos independentes; n = 3-5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média ± SEM. Os valores de p dos testes One-way ANOVA e post hoc de Tukey são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

4.5. A expressão de P2RX7 em células T aumenta a residência de células T CD4⁺ efetoras no parênquima pulmonar resultando em tuberculose grave

Para avaliar se o desenvolvimento de formas graves de tuberculose e a presença de células T CD4⁺ residentes estão relacionados à expressão de P2RX7 em células T, foram gerados camundongos deficientes de P2RX7 somente em células T (*Cd4creP2rx7^{fl/fl}*) (**Figura 15A**). Camundongos *P2rx7^{fl/fl}* foram usados como controle. Como resultado, após a infecção pela cepa MP287, os camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* apresentaram ganho de peso corporal, sendo que o mesmo não foi observado no grupo controle *P2rx7^{fl/fl}* que apresentou acentuada perda de peso corporal 21 dias p.i. (**Figura 15B**). No dia 28 p.i., os pulmões de camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* eram mais leves do que os de camundongos *P2rx7^{fl/fl}* (**Figura 15C**). Além disso, camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* controlaram melhor o crescimento micobacteriano pulmonar do que camundongos *P2rx7^{fl/fl}* (**Figura 15D**). A contagem de células infiltradas no pulmão revelou um número menor destas células em camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* quando comparados com camundongos *P2rx7^{fl/fl}* (**Figura 15E**). A análise histopatológica do tecido pulmonar revelou grande infiltrado inflamatório (#) e presença de áreas necróticas disseminadas (*) em camundongos *P2rx7^{fl/fl}* infectados (**Figura 15F**). Em camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* infectados, observou-se redução do infiltrado inflamatório e menores áreas de necrose.

Depois de avaliar os parâmetros patológicos, acessamos as células T CD4⁺ infiltradas no pulmão de camundongos *P2rx7^{fl/fl}* e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* por citometria de fluxo. Os dados revelaram uma redução na frequência e número total de células T CD44⁺CD4⁺ residentes de camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* infectados (**Figura 15G**) comparados a camundongos *P2rx7^{fl/fl}*. Não houve diferenças significativas no número de células T CD44⁺CD4⁺ intravasculares.

Esses dados indicam que o reconhecimento de eATP via P2RX7 pelas células T contribui para o desenvolvimento de formas graves de tuberculose em camundongos e isso pode estar relacionado a uma redução na infiltração de células T CD44⁺CD4⁺ residentes no parênquima pulmonar.

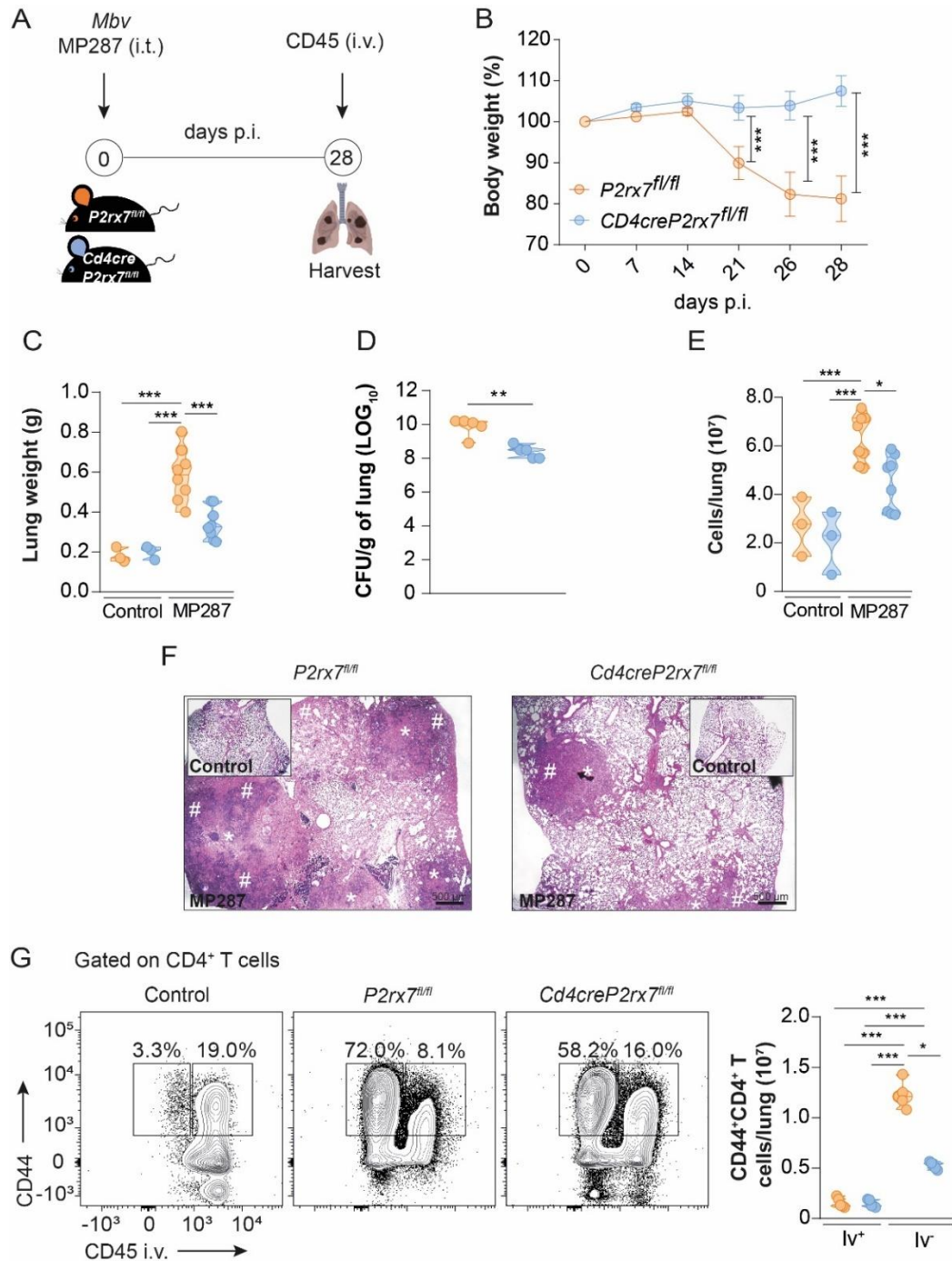


Figura 15: Efeitos da expressão intrínseca de P2RX7 em células T no agravamento da pulmonar causada pela cepa *Mbv* MP287. Camundongos C57BL/6, *P2rx7^{fl/fl}* e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* foram infectados com ~100 bacilos da cepa *Mbv* MP287 hipervirulenta. Camundongos não infectados foram usados como controles. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) Ilustração esquemática do protocolo experimental. (B) Percentual de peso corporal em relação ao dia 0 de infecção. (C) Peso do pulmão total em gramas. (D) CFU por grama de pulmão. (E) Número total de células por pulmão total. (F) Cortes histológicos representativos dos pulmões infectados corados com o HE (500 μm). (*) indicam áreas de necrose e (#) indicam os sítios inflamatórios. (E) Expressão de CD44 e CD45 i.v. em células T CD4⁺. Os dados são de 2 experimentos independentes; n = 3-5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média ± SEM. Os valores de p dos testes One-way ANOVA e post hoc de Tukey são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

4.6. Números intermediários de células T CD4⁺ residentes do pulmão levam à proteção mediada por P2RX7 contra formas graves de tuberculose

Uma vez que já sabemos o efeito de números elevados de células T CD4⁺ em camundongos deficientes de P2RX7, agora gostaríamos de entender o desfecho da tuberculose quando há baixos números de células T CD4⁺ deficientes de P2RX7. Por isso, para investigar se baixos números de células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} influencia na geração de formas graves de tuberculose, camundongos *Cd4*^{-/-} foram infectados pela cepa MP287 e 5 dias p.i. receberam transferência adotiva de 1x10⁶ células T CD4⁺ esplênicas de camundongos WT (WT>*Cd4*^{-/-}) ou *P2rx7*^{-/-} (*P2rx7*^{-/-}>*Cd4*^{-/-}) (**Figura 16A**). Utilizamos camundongos *Cd4*^{-/-} não transferidos como controle, uma vez que não há relatos da infecção destes animais com cepas micobacterianas hipervirulentas.

Os dados demonstram que camundongos *P2rx7*^{-/-}>*Cd4*^{-/-} e *Cd4*^{-/-} perderam peso corporal progressivamente a partir do dia 21 p.i., mas a perda de peso corporal não foi observada em camundongos WT>*Cd4*^{-/-} infectados (**Figura 16B**). No dia 28 p.i., pulmões mais pesados foram encontrados em camundongos *P2rx7*^{-/-}>*Cd4*^{-/-} e *Cd4*^{-/-} em comparação com camundongos WT>*Cd4*^{-/-} (**Figura 16C**). Apoiando um papel crucial para o receptor P2RX7 nas funções efetoras de células T CD4⁺, maiores cargas bacterianas foram observadas nos pulmões de camundongos *P2rx7*^{-/-}>*Cd4*^{-/-} e *Cd4*^{-/-} em comparação com camundongos WT>*Cd4*^{-/-} (**Figura 16D**). A análise histopatológica confirmou a presença de lesões granulomatosas caracterizadas por densos infiltrados celulares (#) em camundongos *P2rx7*^{-/-}>*Cd4*^{-/-} e *Cd4*^{-/-} infectados e áreas extensas de necrose (*) apenas em camundongos *P2rx7*^{-/-}>*Cd4*^{-/-}. Pequenas áreas de inflamação sem necrose foram observadas em camundongos WT>*Cd4*^{-/-} (**Figura 16E**).

Para examinar a razão pela qual números intermediários de células T *P2rx7*^{-/-} CD4⁺ não conseguiram transferir proteção para camundongos *Cd4*^{-/-}, as células T CD4⁺ intravasculares e parenquimatosas foram analisados no dia 28 p.i. por citometria de fluxo. A maioria das células T CD4⁺ foi encontrada no parênquima pulmonar de camundongos WT>*Cd4*^{-/-} infectados, enquanto essas células predominaram na vasculatura pulmonar de camundongos *P2rx7*^{-/-}>*Cd4*^{-/-} infectados (**Figura 16F**). As imagens de microscopia confocal mostram claramente menos células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ infiltrando o pulmão de camundongos *P2rx7*^{-/-}>*Cd4*^{-/-} em comparação com camundongos WT>*Cd4*^{-/-} infectados (**Figura 16G**). Além disso, a

coloração para a alarmina S100A9 produzida por células mieloides evidenciou um intenso dano ao tecido pulmonar em camundongos *P2rx7^{-/-}* *Cd4^{-/-}* infectados.

Os dados descritos neste tópico suportam que números intermediários de células T CD4⁺ deficientes do receptor P2RX7 são ineficazes em fornecer proteção a camundongos *Cd4^{-/-}* infectados com a cepa MP287.

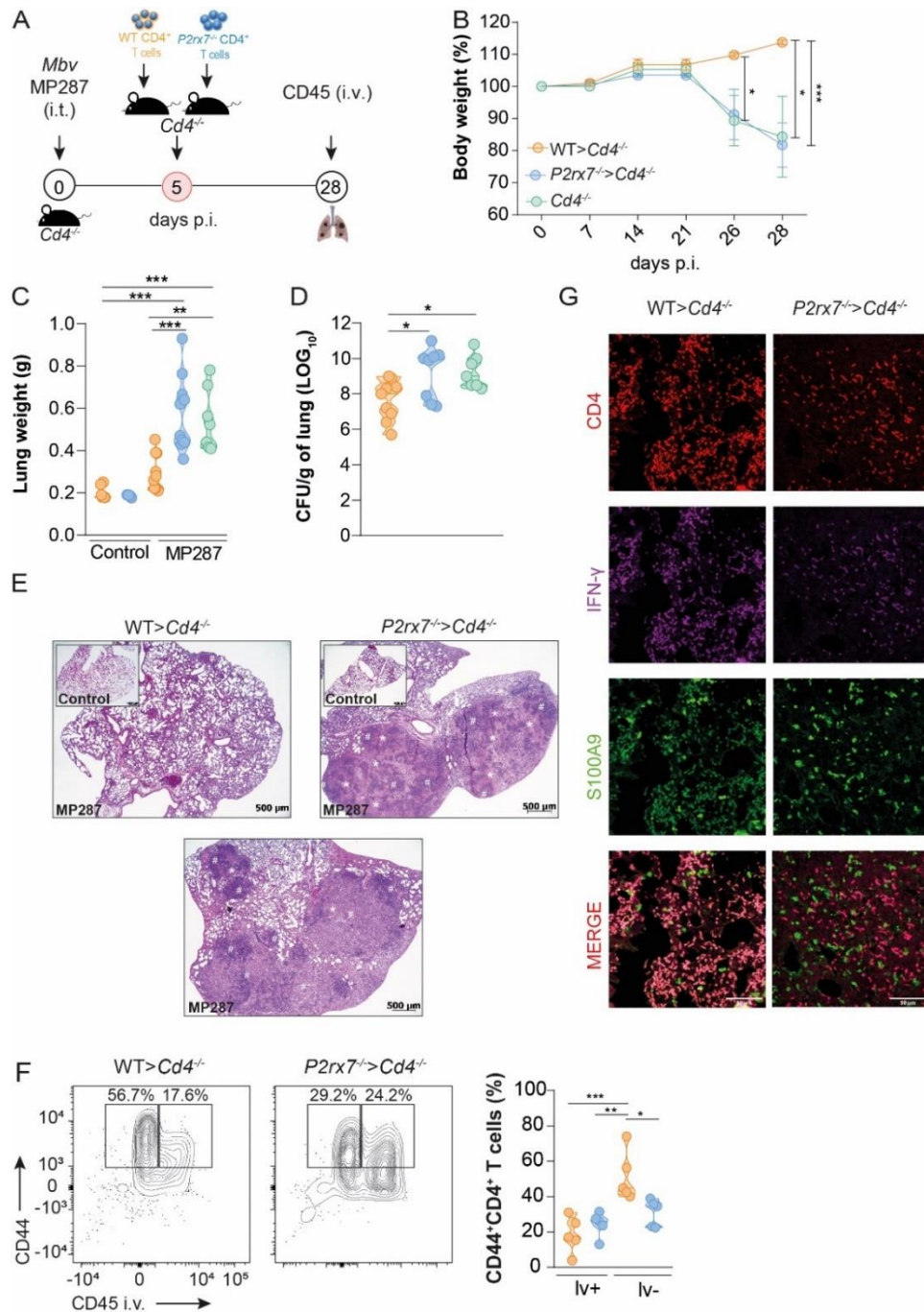


Figura 16: Habilidade de números intermediários de células T CD4⁺ WT e *P2rx7^{-/-}* em acessar o parênquima pulmonar para transferir proteção para camundongos *Cd4^{-/-}* infectados. Camundongos *Cd4^{-/-}* foram infectados com ~100 bacilos da cepa MP287 hipervirulenta. Camundongos não infectados foram usados como controles. No dia 5 p.i. camundongos *Cd4^{-/-}* receberam células T CD4⁺ esplênicas (1×10^6) de camundongos C57BL/6 e *P2rx7^{-/-}*. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) Ilustração esquemática do protocolo experimental. (B) Percentual de peso corporal em relação ao dia 0 de infecção. (C) Peso do pulmão total em gramas. (D) CFU por grama de pulmão. (E) Cortes histológicos representativos dos pulmões infectados corados com o HE (500 μm). (*) indicam áreas de necrose e (#) indicam os sítios inflamatórios. (F) Expressão de CD44 e CD45 i.v. em células T CD4⁺. (G) Imagens representativas de microscopia confocal mostram a expressão de CD4, IFN-γ e S100A9 em tecido pulmonar infectado. As células foram coradas para CD4 (vermelho), IFN-γ (magenta) e S100A9 (verde) (50 μm). Os dados são de 2-4 experimentos independentes; n = 3-5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média ± SEM. Os valores de p dos testes One-way ANOVA e post hoc de Tukey são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

4.7. O receptor P2RX7 promove a residência de células T CD4⁺ efetoras controlando a expressão de CXCR3 e a proliferação celular na tuberculose grave

Para avaliar como as células T CD4⁺ respondem à infecção pela cepa MP287 no mesmo ambiente, células T CD4⁺ WT (CD45.1) e *P2rx7*^{-/-} (CD45.2) foram cotransferidas para camundongos *Cd4*^{-/-} 5 dias p.i. (**Figura 17A**). Nesses experimentos, o nanocorpo anti-ARTC2.2 foi usado para prevenir a morte de células residentes via P2RX7 durante o processamento do tecido pulmonar (BORGES DA SILVA et al., 2019). Confirmando os dados anteriores, no dia 28 p.i., as células T CD4⁺ WT acumularam-se principalmente no parênquima pulmonar, enquanto as células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} predominaram na vasculatura pulmonar (**Figura 17B-C**).

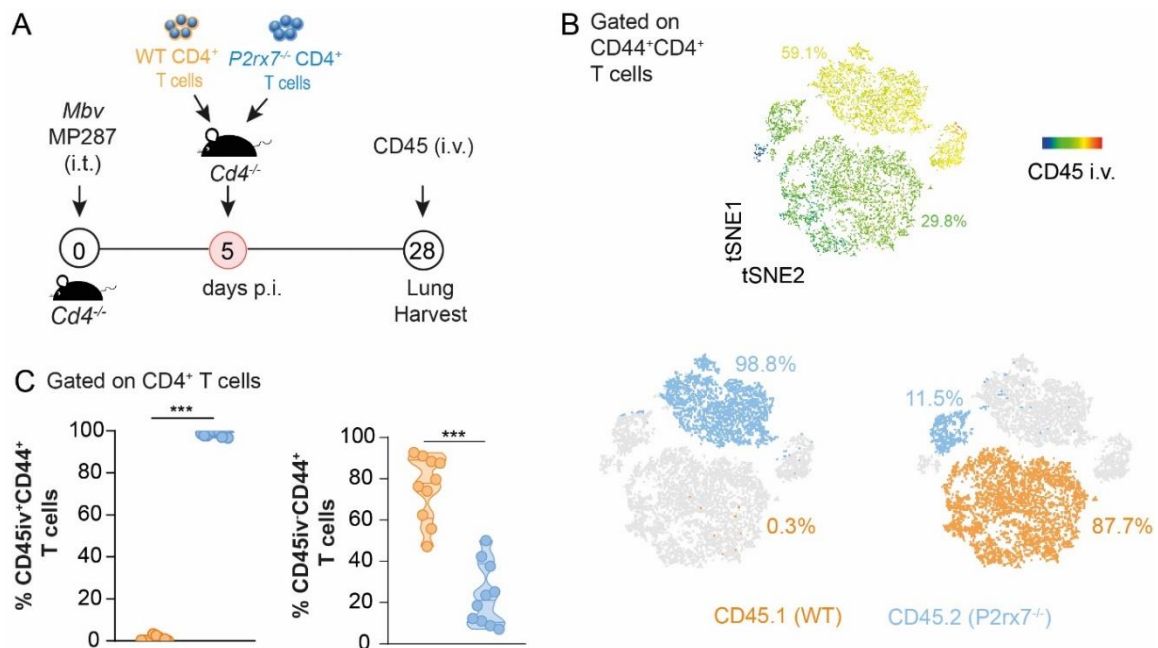


Figura 17: Efeitos da sinalização via P2RX7 na residência de células T CD4⁺ no pulmão na tuberculose grave causada pela cepa *Mbv* MP287. Camundongos *Cd4*^{-/-} foram infectados com ~100 bacilos da cepa MP287 hipervirulenta. No dia 5 p.i. as células T CD4⁺ esplênicas (1x10⁶) de camundongos C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} foram cotransferidas (1:1) para camundongos *Cd4*^{-/-} infectados. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) Ilustração esquemática do protocolo experimental. (B) O gráfico de distribuição espacial em tSNE mostra a expressão de CD45 i.v. através do mapa de calor. As células T CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ estão representadas pelos marcadores sobrepostos CD45.1 e CD45.2. (C) Os gráficos violin mostram a frequência (%) de células T CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ e CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ WT (CD45.1) e *P2rx7*^{-/-} (CD45.2). Os dados são de 2 experimentos independentes; n=5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média ± SEM. Os valores de p do teste T não pareado são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

A partir deste momento mantivemos o foco das nossas análises nas células T CD44⁺CD4⁺ residentes. Os resultados mais relevantes de células CD44⁺CD4⁺ intravasculares serão descritos pontualmente. Avaliamos então as células T CD4⁺ residentes produtoras de IFN- γ e as T-bet⁺. Não foram observadas diferenças na frequência de células T CD44⁺CD4⁺ residentes WT e *P2rx7*^{-/-} produtoras de IFN- γ e T-bet⁺CD44⁺ (**Figura 18A-B**). Em seguida, avaliamos a expressão dos marcadores essenciais para determinar a entrada e estabelecimento de células T CD4⁺ residentes no parênquima pulmonar: CD69, CXCR3 e CX3CR1 (**Figura 18C**). A expressão do CD69 é regulada positivamente nas células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} em comparação com as células CD4⁺ WT. Como demonstrado anteriormente, na infecção por MP287 o receptor de quimiocina CXCR3 é crucial para determinar o fenótipo das células T CD4⁺ residentes no pulmão (**Figura 18C**). Neste contexto, as células T CD4⁺ WT residentes expressam níveis mais elevados de CXCR3 quando comparadas às células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-}. O receptor de quimiocina CX3CR1 é expresso nos mesmos níveis em células T CD4⁺ WT e *P2rx7*^{-/-}.

Também avaliamos a proliferação das células T CD4⁺ residentes. A marcação de Ki-67 indica que as células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} têm capacidade prejudicada de proliferar no parênquima pulmonar (**Figura 18D**). Para confirmar este resultado, os leucócitos foram isolados do pulmão no dia 28 p.i., em seguida corados com *Cell Tracer* e mantidos em cultura *ex vivo* por 48 h. Os dados confirmam que as células T CD4⁺ WT proliferam de forma mais eficiente do que as células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} (**Figura 18E**).

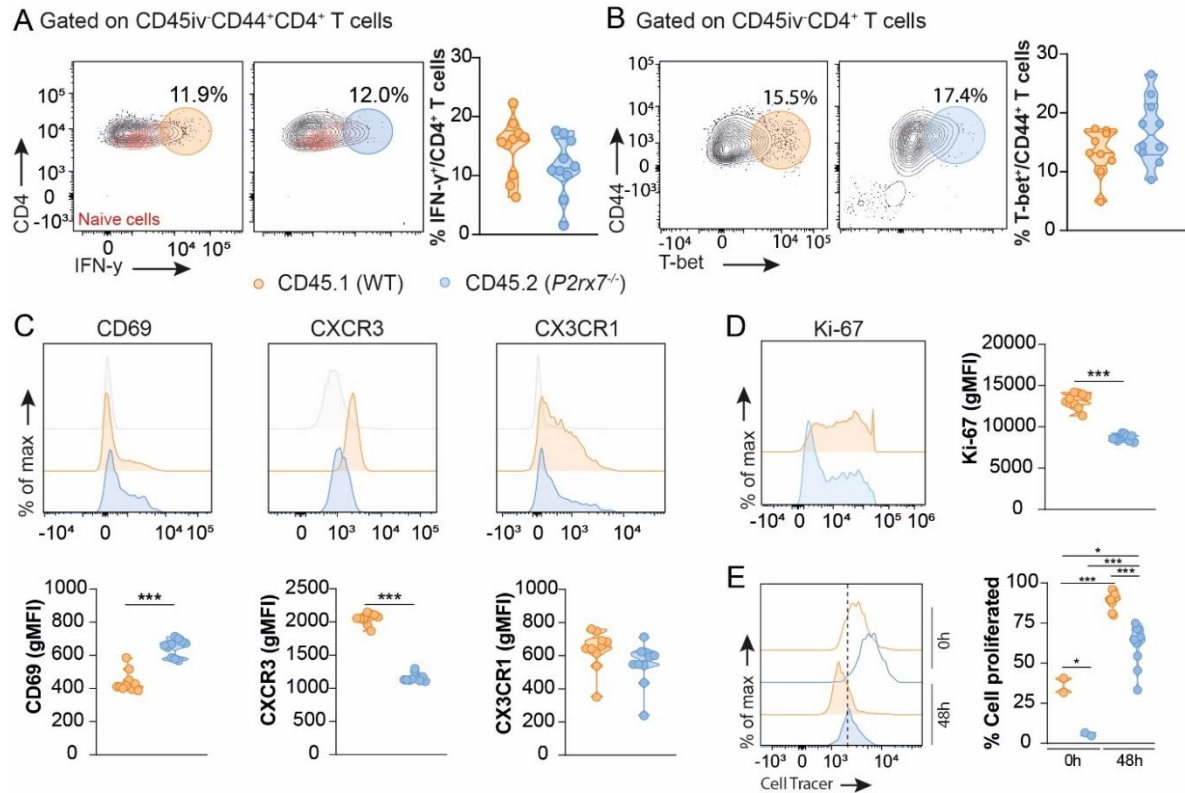


Figura 18: Fenótipo das células T CD4⁺ WT e *P2rx7*^{-/-} residentes no pulmão durante a tuberculose grave causada pela cepa *Mbv* MP287. Camundongos *Cd4*^{-/-} foram infectados com ~100 bacilos da cepa *Mbv* MP287 hipervirulenta. No dia 5 p.i. as células T CD4⁺ esplênicas (1×10^6) de camundongos C57BL/6 e *P2rx7*^{-/-} foram cotransferidas (1:1) para camundongos *Cd4*^{-/-} infectados. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) Expressão de CD4 e IFN- γ em células T CD45iv-CD44⁺CD4⁺ e naïve. (B) Expressão de CD44 e T-bet em células T CD45iv-CD44⁺CD4⁺. (C) Expressão de CD69, CXCR3 e CX3CR1 em células CD45iv-CD44⁺CD4⁺ e naïve. Os gráficos *violin* mostram a Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência (gMFI) dos marcadores. (D) Expressão de Ki-67 em células CD45iv-CD44⁺CD4⁺. O gráfico *violin* mostram a Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência (gMFI) de Ki-67. (E) Expressão de *Cell Tracer* em células CD45iv-CD44⁺CD4⁺ em 0 e 48 h pós marcação. O gráfico *violin* demonstra o percentual de células que proliferaram em relação ao dia 0. Os dados são de 2 experimentos independentes; n=5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média \pm SEM. Os valores de p do teste T não pareado são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Para avaliar se o destino das células T CD4⁺ WT e *P2rx7^{-/-}* foi determinado antes de atingirem o pulmão, analisamos essas células no linfonodo mediastinal (mLN). Os dados indicam que não há diferenças significativas na frequência de células T CD44⁺CD4⁺ WT e *P2rx7^{-/-}* no mLN (**Figura 19A**). No entanto, ao contrário do pulmão, a frequência de células T-bet⁺CD44⁺ WT é maior do que as de células T-bet⁺CD44⁺ *P2rx7^{-/-}* no linfonodo drenante. (**Figura 19B**). Curiosamente, em contraste com o que observamos no pulmão, as células T CD4⁺ *P2rx7^{-/-}* expressam níveis mais elevados de CXCR3 e CX3CR1 do que as células T CD4⁺ WT em mLN (**Figura 19C**).

Os resultados reunidos nesse tópico mostram que o receptor P2RX7 determina o destino das células T CD4⁺, aumentando a capacidade de acúmulo no parênquima pulmonar, controlando a expressão de CXCR3 e a proliferação celular na tuberculose causada pela cepa MP287.

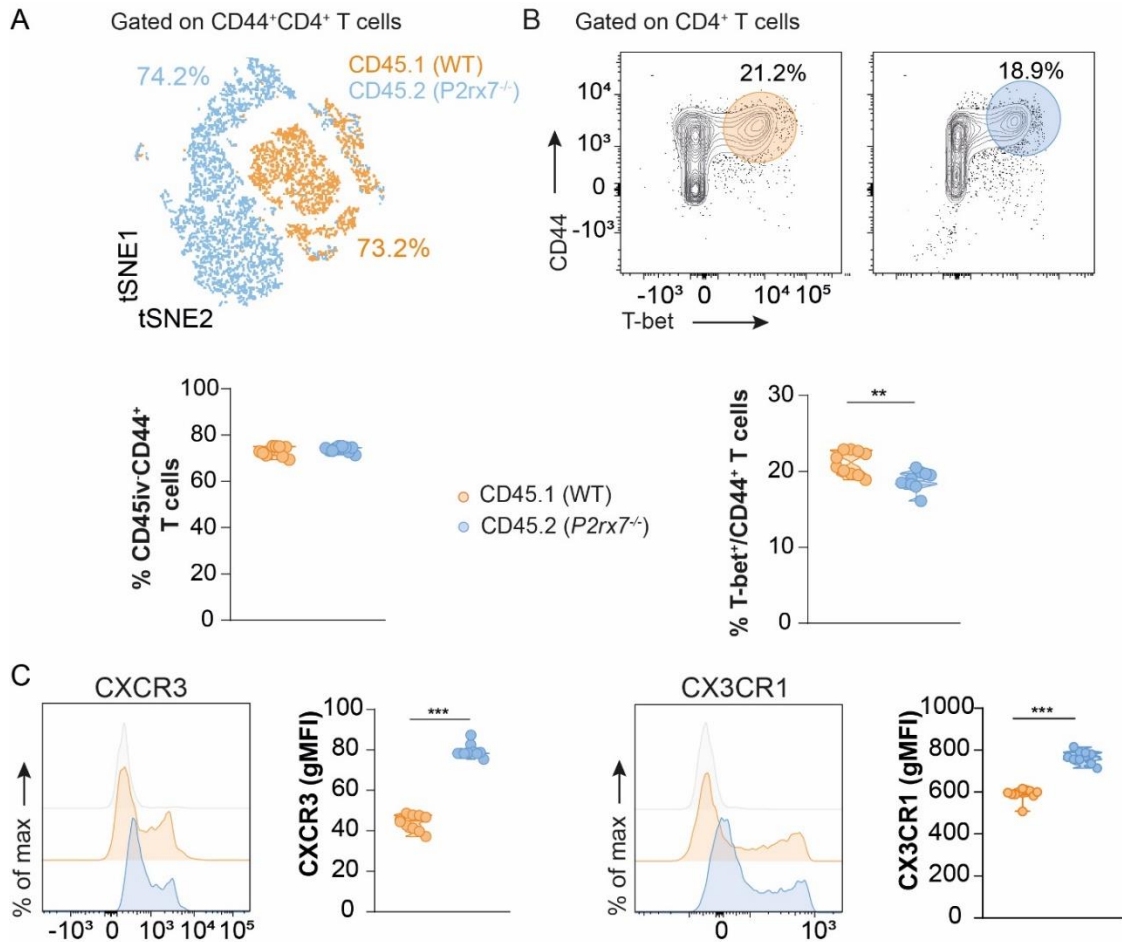


Figura 19: Fenótipo das células T CD4⁺ WT e *P2rx7^{-/-}* no mLN durante a tuberculose grave causada pela cepa *Mbv* MP287. Camundongos *Cd4^{-/-}* foram infectados com ~100 bacilos da cepa MP287 hipervirulenta. No dia 5 p.i. as células T CD4⁺ esplênicas (1×10^6) de camundongos C57BL/6 e *P2rx7^{-/-}* foram cotransferidas (1:1) para camundongos *Cd4^{-/-}* infectados. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) O gráfico de distribuição espacial em tSNE mostra as células T CD44⁺CD4⁺ WT e *P2rx7^{-/-}* que estão representadas pelos marcadores sobrepostos CD45.1 e CD45.2. (B) Expressão de CD44 e T-bet em células T CD44⁺CD4⁺. (C) Expressão de CXCR3 e CX3CR1 em células CD44⁺CD4⁺ e naïve. Os gráficos *violin* mostram a Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência (gMFI) dos marcadores. O gráfico *violin* mostra o percentual de células que proliferaram em relação ao dia 0. Os dados são de 2 experimentos independentes; n=5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média \pm SEM. Os valores de p do teste T não pareado são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Capítulo 2

Papel do receptor P2RX7 em células T CD4⁺ na infecção pelo vírus Influenza

Até aqui, foi possível entender o papel do receptor na residência de células T CD4⁺ efectoras e como isso determina o desfecho da tuberculose. Apesar disso, não se sabia se este fenômeno é infecção específico ou se é generalizável a outras infecções pulmonares. Para responder esta questão, realizamos experimentos com modelo de inflamação pulmonar causada pela cepa virulenta PR8 do vírus Influenza. Estes experimentos foram feitos no Departamento de Imunologia do Hospital Mayo Clinic (Scottsdale, Arizona) sob a supervisão do Prof. Dr. Henrique Borges da Silva.

4.8. O P2RX7 intrínseco das células T é crucial para a inflamação pulmonar e o estabelecimento de células T CD4⁺ residentes na infecção pelo vírus Influenza

Camundongos *Cd4cre* e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* foram infectados e após 7 e 14 dias p.i. os pulmões foram coletados para análise (**Figura 20A**). Camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* são mais protegidos contra inflamação causada pela cepa PR8 do que camundongos *Cd4cre*, apresentando menor perda de peso corporal na fase aguda da infecção (6-8 dias p.i.) (**Figura 20B**). Especificamente no dia 14 p.i., os camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* exibiram pulmões mais leves do que camundongos *Cd4cre* (**Figura 20C**). Não houve diferenças na carga viral entre os grupos experimentais no dia 14 p.i. (**Figura 20D**). Menor infiltração celular também foi observada em camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* em relação aos camundongos *Cd4cre* (**Figura 20E**). Além disso, no dia 14 p.i., o lobo pulmonar superior direito de camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* possuía tamanho menor do que aquele de camundongos *Cd4cre*, assemelhando-se a camundongos controles não infectados (**Figura 20F**). Isso indica uma recuperação mais acelerada do tecido pulmonar. Os cortes histológicos (Tricomo de Masson) demonstram que apenas no dia 14 p.i. há redução na pneumonia causada pela cepa PR8 em camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}*, mas não em camundongos *Cd4cre* (**Figura 20G**). Nossas análises histológicas também mostraram formação de fibrose no pulmão de camundongos *Cd4cre*, mas não de camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}*.

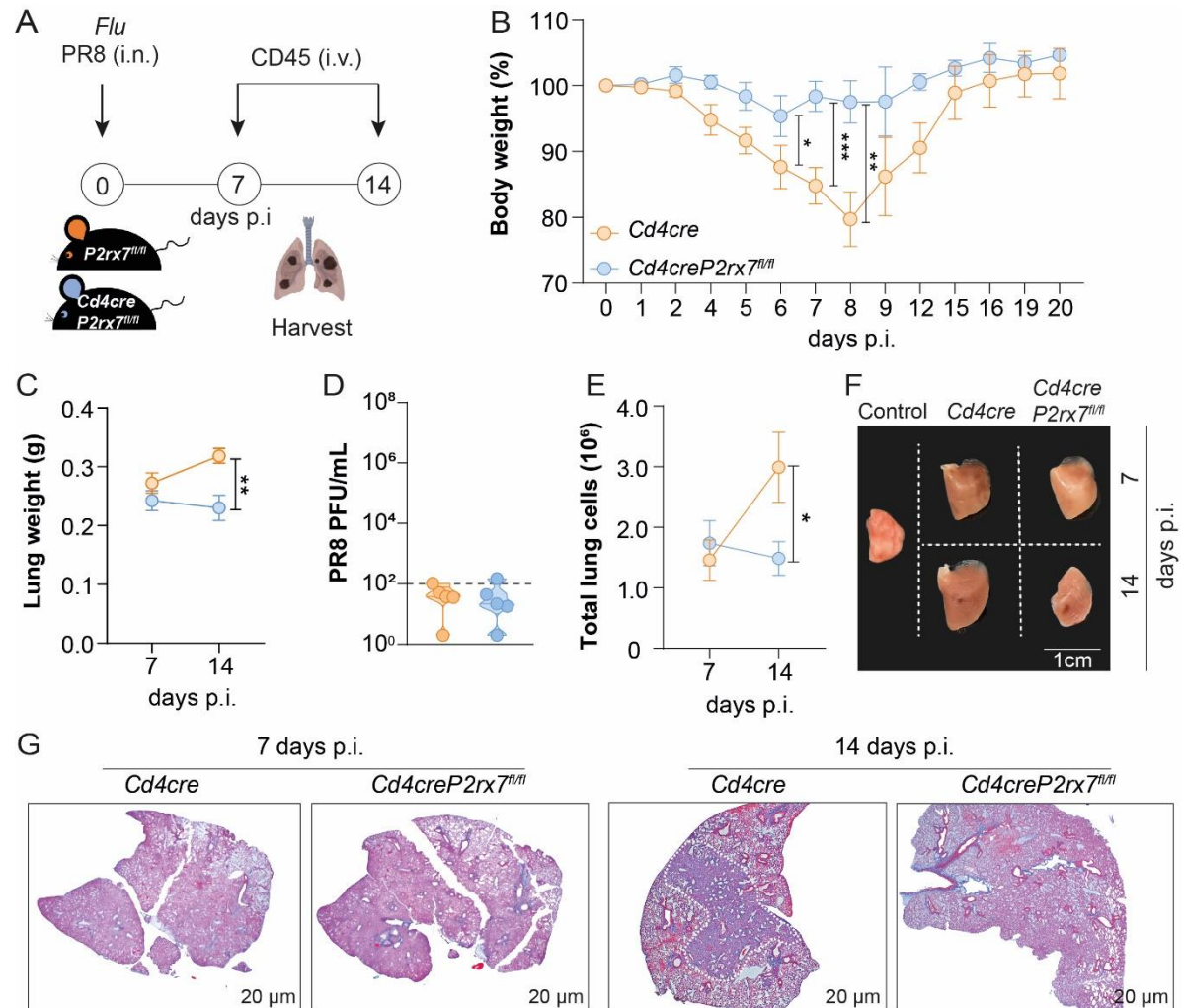


Figura 20: Papel do receptor P2RX7 expresso por células T na inflamação pulmonar causada pelo vírus Influenza. Camundongos *Cd4cre* e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* foram infectados com o vírus Influenza (PR8 - 1400 PFU). Camundongos não infectados foram usados como controles. Nos dias 7 e 14 p.i., os camundongos foram eutanasiados para coleta do pulmão. (A) Ilustração esquemática do protocolo experimental. (B) Percentual de peso corporal em relação ao dia 0 de infecção. (C) Peso do pulmão total em gramas. (D) Carga viral por mL determinada por qPCR no dia 14 p.i. (E) Número total de células por pulmão total. (F) Imagens macroscópicas dos lobos pulmonares superiores direitos são mostradas (1 cm). (G) Cortes histológicos representativos dos pulmões infectados corados com Tricomo de Masson (20 μm). Os dados são de 2 experimentos independentes; n = 3-5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média ± SEM. Os valores de p do teste T não pareado são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Em seguida, acessamos a localização das células T CD4⁺ nos pulmões infectados e observamos a presença de 3 populações de células CD44⁺CD4⁺. O nível de marcação para o anticorpo anti-CD45 i.v. determina as diferenças de localização das populações (**Figura 21A**). Há uma população CD45^{hi}CD44⁺CD4⁺ que aparenta estar no sangue e por isso é mais acessível ao anti-CD45 i.v. Outra população CD45^{iv}⁺CD44⁺CD4⁺ que pode estar de fato na vasculatura pulmonar, possivelmente aderida ao endotélio vascular. E por fim, a população CD45^{iv}⁻CD44⁺CD4⁺ que pode ser caracterizada como residente do parênquima pulmonar.

Interessantemente, camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* apresentam maior número de células CD45^{hi}CD44⁺CD4⁺ nos dias 7 e 14 p.i. do que camundongos *Cd4cre* (**Figura 21B**). Já os números de células CD45^{iv}⁺CD44⁺CD4⁺ está aumentado somente em camundongos *Cd4cre*. Confirmando o que foi observado na tuberculose grave, o número de células CD44⁺CD4⁺ residentes está reduzido em camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* quando comparados com camundongos *Cd4cre*.

vírus influenza e isso está relacionado à capacidade prejudicada de infiltração de células T CD4⁺ residentes no parênquima pulmonar.

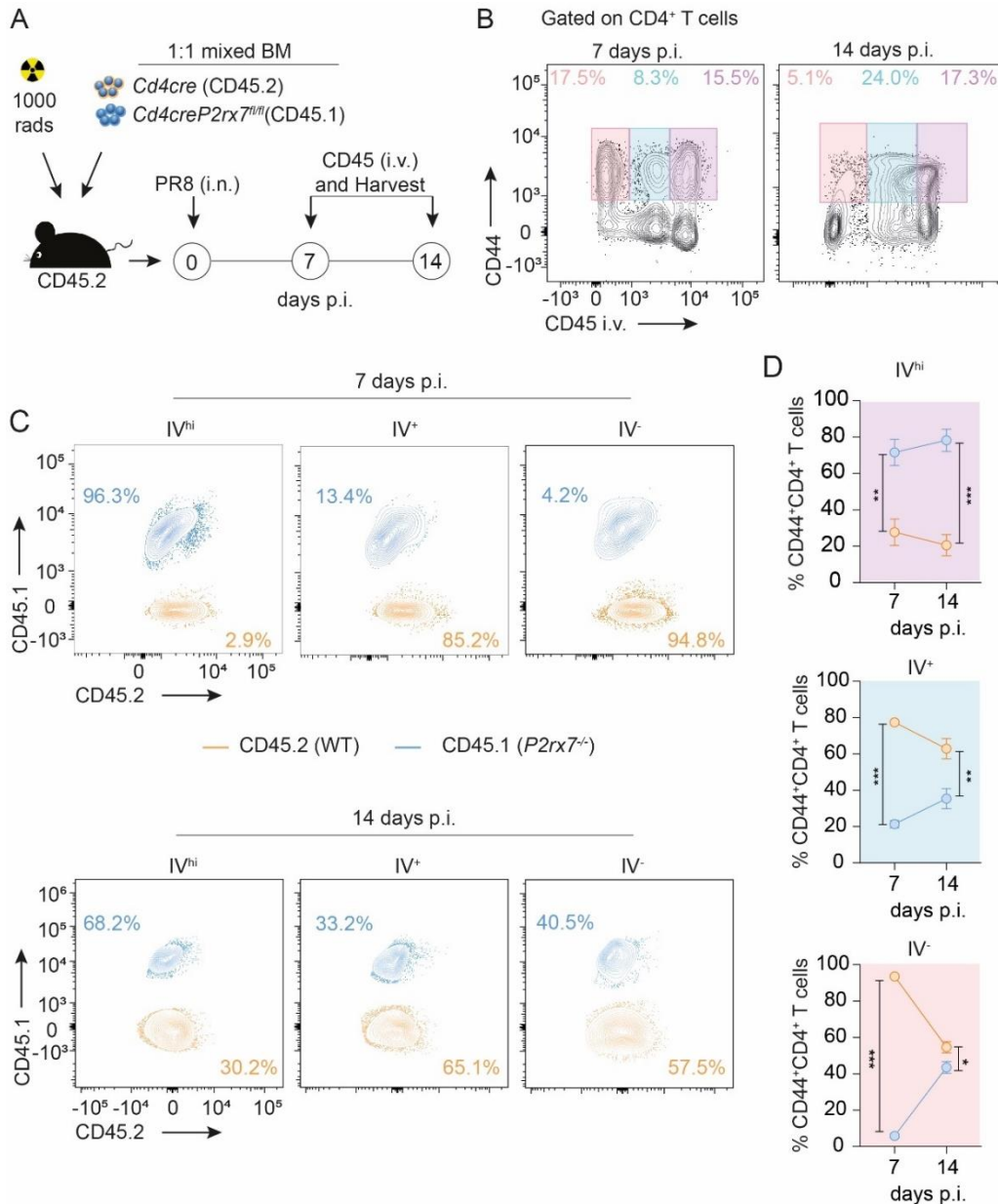


Figura 22: Efeitos da sinalização via P2RX7 na residência de células T CD4⁺ no pulmão na infecção pelo vírus Influenza. Camundongos quimeras mistas (1:1) foram geradas utilizando a medula óssea de camundongos *Cd4cre* (CD45.2) e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}*. Após a reconstituição, os camundongos foram infectados com o vírus Influenza (PR8 - 1400 PFU). Nos dias 7 e 14 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) Ilustração esquemática mostrando o protocolo experimental. (B) Expressão de CD45iv e CD44 em células T CD4⁺ no pulmão. (C) Expressão de CD45.1 e CD45.2 em células T CD45iv^{hi}CD44⁺CD4⁺, CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ e CD45iv⁻CD44⁺CD4⁺ no pulmão. (D) Os gráficos de linha mostram o número total de células CD45iv^{hi}CD44⁺CD4⁺, CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ e CD45iv⁻CD44⁺CD4⁺ no pulmão nos dias 7 e 14 p.i. Os dados são de 2 experimentos independentes; n = 3-5 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média ± SEM. Os valores de p do teste T não pareado são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

4.9. A sinalização via P2RX7 em células T CD4⁺ residentes leva ao aumento da expressão de genes relacionados à migração e proliferação celular durante a infecção pelo vírus Influenza

Em busca dos mecanismos envolvidos nos fenômenos observados até aqui, procuramos definir as vias diferentemente expressas entre células T CD4⁺ residentes WT e *P2rx7*^{-/-}. Isolamos as células T CD4⁺ experimentadas da vasculatura e parênquima pulmonar de camundongos *Cd4cre* e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* infectados com o vírus Influenza e realizamos uma análise RNA-seq. A partir disso, detectamos mais de 1000 genes diferencialmente expressos entre células T CD4⁺ WT e *P2rx7*^{-/-} no tecido (**Figura 23A**). As poucas células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} residentes do parênquima pulmonar se agrupam separadas das células T CD4⁺ WT. Inesperadamente, as células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} intravasculares encontram-se transcricionalmente entre as células T CD4⁺ WT intravasculares e parenquimatosas (**Figura 23B**). Ambas as tendências também são aparentes quando os principais genes expressos diferencialmente são avaliados entre esses grupos (**Figura 23C**).

Também realizamos análises de enriquecimento de vias desses grupos experimentais e descobrimos que em comparação com células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} residentes, houve aumento da expressão de genes das vias de sinalização de ciclo celular, adesão e quimiocinas em células T CD4⁺ WT residentes no pulmão (**Figura 23D**). Confirmando esta tendência, a expressão do gene de proliferação *Mki67* (que codifica Ki-67), bem como de *Cxcr3* e *Cx3cr1* está diminuída em células CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} residentes no pulmão (Figura 24E). A expressão proteica de Ki-67 e CXCR3 está correspondentemente diminuída em células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} residentes, enquanto a expressão de CX3CR1 está aumentada (**Figura 23F**).

Mecanicamente, estes dados indicam que a deficiência do receptor P2RX7 em células T CD4⁺ reduz a expressão de genes importantes para migração destas células para o parênquima pulmonar e de genes relacionados à proliferação destas células no tecido. Isso impede o acúmulo excessivo das células T CD4⁺ efetoras no parênquima pulmonar e previne a geração de formas graves das infecções pulmonares.

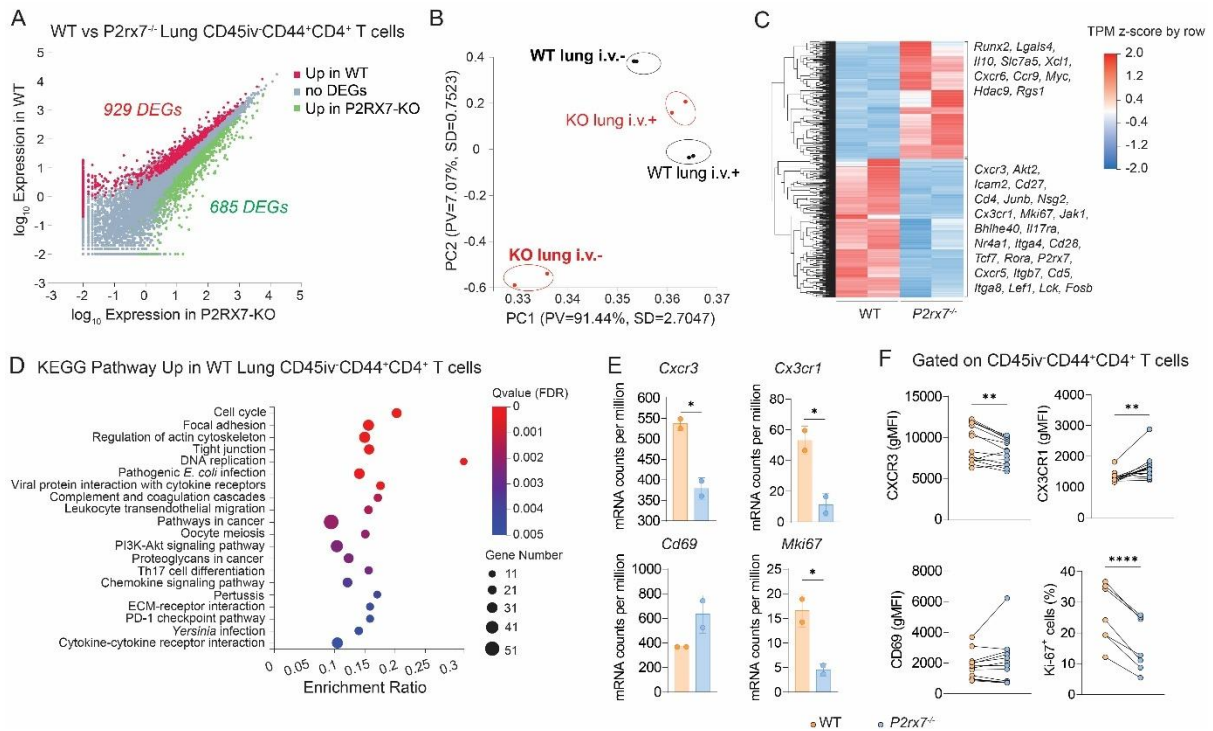


Figura 23: Efeitos da expressão intrínseca de P2RX7 na expressão de moléculas de proliferação celular e adesão tecidual em células T CD4⁺ residentes do pulmão. Camundongos *Cd4cre* e células *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* foram infectados com o vírus Influenza (PR8 - 1400 PFU). No dia 7 p.i. as células T CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ e CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ do pulmão foram isoladas por *cell sorting* e a análise RNA-seq foi realizada. (A) Gráfico de dispersão com genes diferencialmente expressos (DEGs) destacados entre células T CD4⁺ residentes WT e *P2rx7*^{-/-} (B) Gráficos de Análise de Componente Principal (PCA) representando as assinaturas transcricionais relativas de células T CD4⁺ parenquimatosas e intravasculares. (C) *Heatmap* exibindo os DEGs entre células T CD4⁺ residentes WT e *P2rx7*^{-/-}; DEGs representativos mais altos em células T CD4⁺ WT ou *P2rx7*^{-/-} estão mostrados. (D) Lista de vias de transcrição enriquecidas em células T CD4⁺ residentes WT do pulmão em comparação com *P2rx7*^{-/-} (E) Valores de mRNA por milhão para *Cxcr3*, *Cx3cr1*, *Cd69* e *Mki67* em células T CD4⁺ WT e *P2rx7*^{-/-}. (F) Em outros experimentos, camundongos *Cd4cre* e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* foram infectados com PR8 e a expressão proteica de diferentes moléculas foi avaliada por citometria de fluxo (dia 7 p.i.). Valores médios de gMFI para CXCR3, CX3CR1, CD69 e porcentagens de células Ki-67⁺ em células T CD4⁺ residentes WT e *P2rx7*^{-/-} são mostrados. Para o RNA-seq cada replicata é um pool de células T CD4⁺ residentes, n=5 camundongos por grupo. Em (F), os dados são de 2 experimentos independentes; n=3-4 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média ± SEM. Os valores de p do teste T não pareado são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

4.10. A liberação parácrina de eATP através dos canais panexina-1 regula a entrada de células T CD4⁺ no parênquima pulmonar

Após definir que a detecção de eATP via P2RX7 promove a residência pulmonar de células T CD4⁺ em resposta a infecções locais, nosso objetivo foi definir a origem da fonte de eATP nos pulmões de camundongos infectados e como ela influencia a entrada e estabelecimento de células T CD4⁺ residentes no pulmão. A ação dos canais Panexina-1 (Panx-1) como fonte de eATP pulmonar foi recentemente demonstrada no contexto da exposição a alérgenos (MEDINA et al., 2021). Assim, avaliamos o papel de Panx-1 na residência de células T CD4⁺ pulmonares em resposta à infecção por Influenza. Para isso, camundongos deficientes de Panx-1 (*CMVcrePanx1^{fl/fl}*) e WT (*CMVcre*) foram infectados com a cepa PR8. Inicialmente avaliamos os parâmetros de proteção. Camundongos *CMVcrePanx1^{fl/fl}* perdem menos pesos do que camundongos *CMVcre* (**Figura 24A**). Pulmões mais leves também foram observados em camundongos *CMVcrePanx1^{fl/fl}* em comparação com camundongos *CMVcre* (**Figura 24B**). Não há diferenças na carga viral entre os grupos no dia 7 p.i. (**Figura 24C**). Adicionalmente, observamos que o número de células T CD45iv⁻CD44⁺CD4⁺ está reduzido em camundongos *CMVcrePanx1^{fl/fl}* em comparação com camundongos *CMVcre*.

Para avaliar se os efeitos observamos nos camundongos deficientes de Panx-1 estava relacionada à expressão do gene em células T, infectamos camundongos deficientes de Panx-1 em células T (*Cd4crePanx1^{fl/fl}*). Camundongos *Cd4cre* foram utilizados como controle. Não houve diferenças entre os grupos quanto ao peso corporal, peso pulmonar, carga viral e número de células T CD45iv⁻CD44⁺CD4⁺ (**Figura 24E-H**).

Juntos, estes dados indicam que a expressão de canais de Panx-1 é crucial para a infiltração de células T CD4⁺ residentes no pulmão durante a infecção pelo vírus Influenza. Contudo, este fenômeno não está relacionado com a expressão de Panx-1 somente em células T. Os canais de Panx-1 são, possivelmente, a fonte de eATP que as células T CD4⁺ sentem via P2RX7 e que contribui para a entrada e acúmulo no tecido pulmonar.

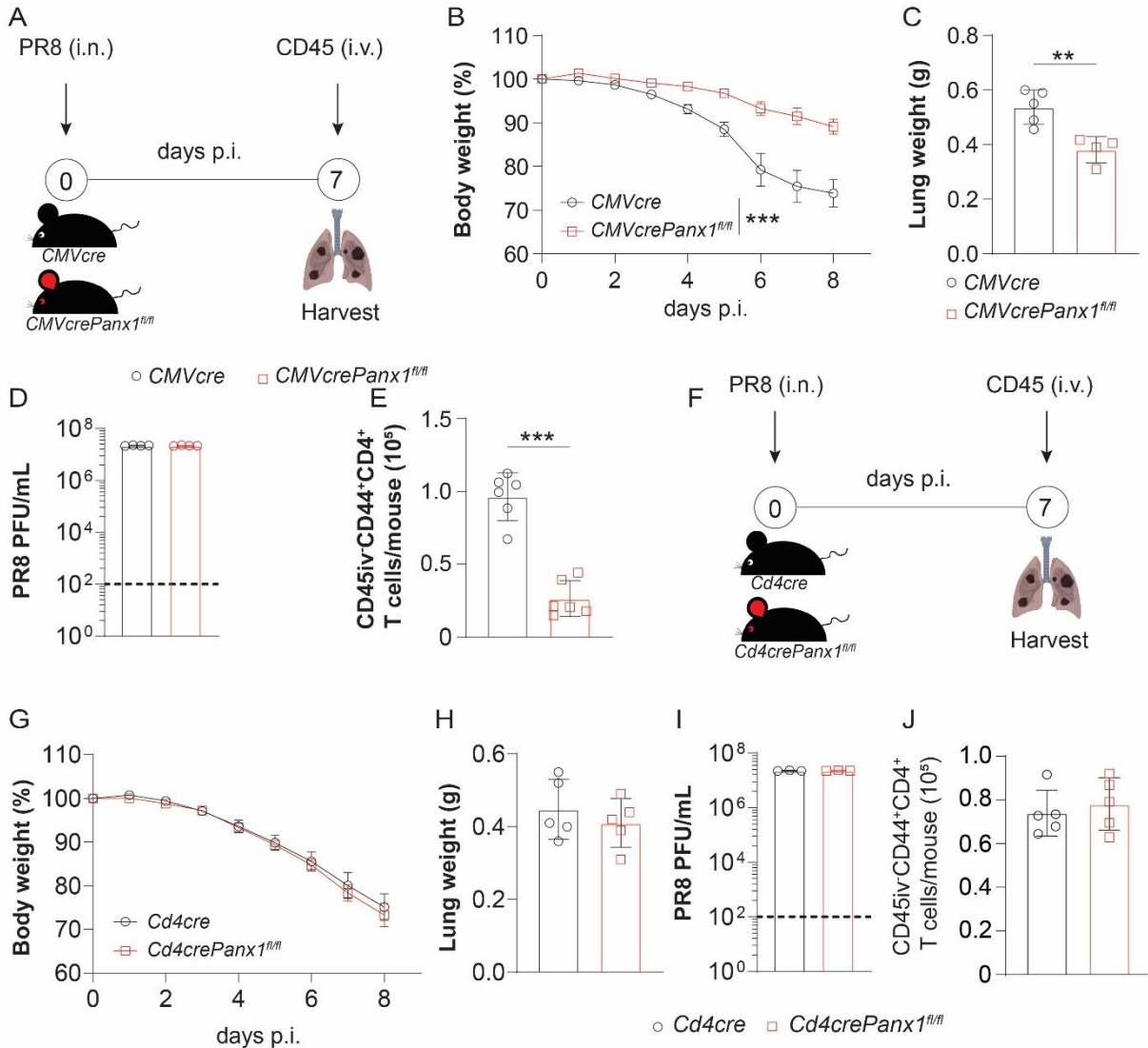


Figura 24: Efeitos dos canais de Panx-1 na infecção pelo vírus Influenza e na residência de células T CD4⁺. Camundongos *CMVcre*, *CMVcrePanx1^{fl/fl}*, *Cd4cre* e *Cd4crePanx1^{fl/fl}* foram infectados com o vírus Influenza (PR8 - 1400 PFU). No dia 7 p.i. os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpos fluorescentes anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A) Ilustração esquemática mostrando o protocolo experimental. (B) Percentual de peso corporal em relação ao dia 0 de infecção de camundongos *CMVcre* e *CMVcrePanx1^{fl/fl}*. (C) Peso do pulmão total em gramas de camundongos *CMVcre* e *CMVcrePanx1^{fl/fl}*. (D) Carga viral por mL no pulmão de camundongos *CMVcre* e *CMVcrePanx1^{fl/fl}* determinada por qPCR. (E) Número total de células T CD45iv-CD44⁺CD4⁺ por pulmão camundongos *CMVcre* e *CMVcrePanx1^{fl/fl}*. (F) Ilustração esquemática mostrando o protocolo experimental. (G) Percentual de peso corporal em relação ao dia 0 de infecção de camundongos *Cd4cre* e *Cd4crePanx1^{fl/fl}*. (H) Peso do pulmão total em gramas de camundongos *Cd4cre* e *Cd4crePanx1^{fl/fl}*. (I) Carga viral por mL no pulmão de camundongos *Cd4cre* e *Cd4crePanx1^{fl/fl}* determinada por qPCR. (J) Número total de células T CD45iv-CD44⁺CD4⁺ por pulmão camundongos *Cd4cre* e *Cd4crePanx1^{fl/fl}*. Os dados são de 2 experimentos independentes; n = 2-3 por grupo experimental. Os dados gráficos são mostrados como média ± SEM. Os valores de p do teste T não pareado são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

5 *Discussão*

As células T CD4⁺ são cruciais para a defesa do hospedeiro contra infecções pulmonares, sendo até alvo para o estudo de vacinas. Contudo, há um grande dilema envolvendo a resposta de células T CD4⁺ durante infecções pulmonares (BARBER, 2017). Apesar de serem potentes em conferir proteção, a resposta efetora excessivo de células T CD4⁺ pode trazer danos irreversíveis a tecidos com baixa capacidade regenerativa. Alguns grupos de pesquisa cogitaram o papel controverso das células T CD4⁺, mas nenhum havia demonstrado de forma sólida o potencial patológico destas células. Neste trabalho, demonstramos o lado ruim da resposta de células T CD4⁺, onde elas podem determinar o agravamento de doenças pulmonares causadas por micobactéria hipervirulenta e pelo vírus Influenza.

Nosso modelo de tuberculose grave induzido pela micobactéria hipervirulenta MP278 já foi descrito como o melhor para entender os fatores que agravam a doença (AMARAL et al., 2014; BOMFIM et al., 2021; SANTIAGO-CARVALHO et al., 2021). A infecção por MP287 induz a morte necrótica das células infectadas e liberação de DAMPs. Isso gera lesão pulmonar agressiva e irreversível que aumenta a morbidade e mortalidade dos camundongos infectados em 28 dias p.i. Essa doença grave só pode ser observada com cepas hipervirulentas. A cepa de baixa virulência, *Mtb* H37Rv, não gera patologia necrótica no pulmão e 100% dos camundongos sobrevivem, entrando em fase crônica 40 dias p.i. (RIBEIRO et al., 2014; AMARAL et al., 2014; ALMEIDA et al., 2017).

As diferenças entre a tuberculose causada por MP287 e H37Rv não se limitam somente a patologia, mas também ao infiltrado e localização de células T CD4⁺ no tecido. Em camundongos infectados com H37Rv, as células T CD4⁺ específicas para *Mtb* estão localizadas majoritariamente na vasculatura pulmonar (SAKAI et al., 2014). Somente um baixo número de células T CD4⁺ que produzem baixos níveis de IFN- γ conseguem acessar o tecido e gerar proteção contra o *Mtb*. Em nosso modelo, o oposto foi observado. A infecção por MP287 induz o alto infiltrado de células T CD4⁺ no parênquima e somente uma pequena parte é encontrada na vasculatura pulmonar.

Estas comparações trouxeram à tona o questionamento de que o acúmulo excessivo de células T CD4⁺ no parênquima pulmonar poderia ser a causa e não a consequência do agravamento da infecção por MP287. A depleção das células T CD4⁺ confirmou que, na fase de agravamento da infecção, estas células contribuem para severidade da doença. Adicionalmente, o modelo de transferência de diferentes quantidades (1×10^6 ou 3×10^6) de células T CD4⁺ reforçaram que o número de células

que acessam o parênquima pulmonar é determinante para gerar proteção ou piora da tuberculose. A explicação para este fenômeno pode estar na produção excessiva de citocinas como IFN- γ e TNF- α . A alta produção destas citocinas no tecido pode induzir o acúmulo de mais células imunes, hiperativação de macrófagos, morte celular, dentre outros efeitos (LIU & JANEWAY, 1990; ADLER et al., 1994; COLLINS et al., 2020). Se tratando de uma infecção grave em um tecido sensível à inflamação, essa resposta desregulada pode causar danos ao pulmão, comprometendo a fisiologia respiratória. Neste contexto, a entrada de quantidades intermediárias de células T CD4⁺ que produzem baixos níveis de IFN- γ é suficiente para contribuir para a eliminação dos bacilos sem causar danos ao tecido.

Em busca de mecanismos envolvidos no acúmulo de células T CD4⁺ residentes que observamos na infecção por MP287, avaliamos o fenótipo destas células utilizando marcadores que caracterizam células intravasculares e parenquimatosas. Além disso, a expressão destes marcadores ainda não havia sido demonstrada em uma infecção por cepa hipervirulente. Na infecção por MP287, os marcadores que determinam a divisão entre células T CD4⁺ intravasculares e parenquimatosas (além do CD45 i.v.) são principalmente CX3CR1 e CXCR3, respectivamente. O KLRG1, que na infecção por H37Rv é expresso principalmente em células T CD4⁺ intravasculares (REILEY, et al., 2010; SAKAI et al., 2014; SALLIN et al., 2017), não contribuiu para separação das populações na infecção por MP287. Este marcador foi expresso em altos níveis em ambas populações. Isso indica que a infecção pela cepa MP287 induz a diferenciação de células T CD4⁺ efetoras terminais não apenas na vasculatura, mas também no parênquima pulmonar.

O P2RX7 não havia sido descrito como um marcador determinante para caracterização de células T CD4⁺ intravasculares e parenquimatosas na tuberculose. Assim, neste estudo demonstramos que este receptor é um importante marcador para determinar o fenótipo e localização de células T CD4⁺ no tecido pulmonar. As células T CD4⁺ residentes expressam níveis mais altos de P2RX7 em comparação com as células T CD4⁺ da vasculatura. Isso pode ser consequência dos altos níveis de eATP que são liberados no parênquima pulmonar devido a morte de células infectadas pela cepa MP287 (RIBEIRO et al., 2014; AMARAL et al., 2014; GRASSI, 2020).

Em infecções virais, a expressão de P2RX7 tem papel crucial na geração e manutenção de células TRMs em vários órgãos não linfoides (BORGES DA SILVA et al., 2018; BORGES DA SILVA et al., 2020). Adicionalmente, sabemos que o P2RX7

tem baixa afinidade pelo eATP e precisa sentir altos níveis do nucleotídeo para ser ativado (DI VIRGILIO et al., 2001). Nosso grupo já demonstrou que em infecções por cepas hipervirulentas há alta liberação eATP e a expressão de P2RX7 em células hematopoiéticas é determinante para a geração de formas graves de tuberculose (AMARAL et al., 2014; BOMFIM et al., 2017). A infecção pela cepa MP287 gera um dano pulmonar grave e alta liberação de eATP. Diante disso, decidimos avaliar se o receptor P2RX7 era capaz de guiar o acúmulo de células T CD4⁺ residentes efetoras e contribuir para o agravando da patologia pulmonar durante infecções.

Camundongos deficientes de P2RX7 infectados com MP287 desenvolvem tuberculose branda e redução no número de células T CD4⁺ residentes em comparação com camundongos WT. Uma possível interpretação para a este resultado pode ser a redução do dano pulmonar e da carga bacteriana em camundongos *P2rx7^{-/-}* infectados, resultando em menor acúmulo dessas células no parênquima pulmonar. Por se tratar de um camundongo *full knockout*, esse modelo não é suficiente para afirmar que a redução no número de células T CD4⁺ residentes ocorre exclusivamente devido à deficiência de P2RX7 nestas células. Consequentemente, outros modelos experimentais foram utilizados para investigar o papel do receptor P2RX7 em células T.

Avaliamos se a expressão intrínseca de P2RX7 em células T era responsável pelos fenômenos de proteção e redução de células T CD4⁺ residentes utilizando camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}*. Como em camundongos *P2rx7^{-/-}*, uma importante proteção contra a infecção por MP287 também foi observada em camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}*. Uma possível explicação para este achado é que a proteção contra formas graves de tuberculose observada em camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* está relacionada com a redução da população de células T CD4⁺ residentes. Portanto, a redução do infiltrado de células T CD4⁺ no parênquima pulmonar previne o agravamento da tuberculose causada pela cepa MP287.

Neste ponto do estudo nos preocupamos em avaliar se os dados obtidos até o momento eram reprodutíveis em outro modelo de infecção pulmonar. Escolhemos o modelo de infecção com a cepa PR8 do vírus Influenza. Este modelo de infecção gera uma inflamação robusta e intenso infiltrado de células T CD4⁺ no parênquima pulmonar (SUN et al., 2009; GOPLEN et al., 2020). Infectando camundongos *Cd4cre* e *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* com a cepa PR8 confirmamos que os resultados obtidos em modelo de tuberculose não é infecção específico, podendo ser extrapolado para a infecção

pelo vírus Influenza. Diferente da infecção por MP287, que tem 100% de mortalidade em 30 dias p.i. (BOMFIM et al., 2021), o modelo de infecção por PR8 nos permitiu avaliar a recuperação dos camundongos infectados. Esta condição nos mostrou que a expressão de P2RX7 em células T contribui para a intensificação da inflamação, deixando sequelas (fibrose) após a eliminação viral 14 dias p.i. Estes achados também suportam que o acúmulo das células T CD4⁺ efetoras residentes durante a infecção por MP287 e PR8 leva ao agravamento do dano pulmonar.

Devemos considerar que camundongos *Cd4creP2rx7^{fl/fl}* também são deficientes de P2RX7 em células T CD8⁺. Sabemos que na tuberculose as células T CD8⁺ não são cruciais para a resposta antimicrobiana, mas elas são centrais na resposta antiviral. Por isso, utilizamos modelos de transferência adotiva para camundongos *Cd4^{-/-}* infectados, na busca de realmente estudar os efeitos da deficiência de P2RX7 somente em células T CD4⁺. Este modelo já foi utilizado pelo nosso grupo para estudar o papel do receptor P2RX7 na geração de células T CD4⁺ Th1 na malária experimental (SALLES et al., 2017). Neste contexto, escolhemos quantidades intermediárias (1×10^6) de células T CD4⁺ WT e *P2rx7^{-/-}* para as transferências, uma vez que já sabemos o efeito de altas quantidades destas células em camundongos WT e *P2rx7^{-/-}*.

Como já esperávamos, a transferência de 1×10^6 células T CD4⁺ WT para camundongos *Cd4^{-/-}* infectados por MP287 gerou alta proteção contra formas graves de tuberculose. Interessantemente, quando transferimos 1×10^6 células T CD4⁺ *P2rx7^{-/-}*, estas não foram capazes de conferir proteção aos camundongos *Cd4^{-/-}*. Uma boa explicação para este fenômeno é que as células T CD4⁺ *P2rx7^{-/-}* possuem habilidade reduzida de entrada no parênquima pulmonar. Se não há entrada de quantidades intermediárias de células T CD4⁺, não há interação das células T CD4⁺ com os macrófagos e DCs infectados (GAUTAM et al., 2017; MEHRA et al., 2012). Isso permite o crescimento micobacteriano descontrolado, gerando um quadro infeccioso grave, como observado em camundongos *P2rx7^{-/-}>Cd4^{-/-}*. Os dados de citometria confirmaram que 56% de células T CD4⁺ WT foram localizadas no parênquima pulmonar, enquanto somente 29% das Células T CD4⁺ *P2rx7^{-/-}* acessaram o tecido.

É importante mencionar que a expressão de P2RX7 direciona a diferenciação para o perfil Th1 na malária experimental (SALLES et al., 2017) e observamos o mesmo quando avaliamos estas células no mLN durante a infecção por MP287.

Contudo, no pulmão não há quaisquer diferenças na frequência de células T Tbet⁺CD4⁺ ou na produção de IFN- γ quando comparamos células T CD4⁺ WT e *P2rx7*^{-/-}. Portanto, se quantidades intermediárias de células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} conseguem acessar o tecido infectado, estas células podem exercer sua função efetora normalmente. Possivelmente, isso é que acontece em camundongos *P2rx7*^{-/-}.

A frequência de células T CD44⁺CD4⁺ no mLN no dia 28 p.i, por MP287 não muda entre células WT e *P2rx7*^{-/-}. Portanto, as diferenças em quantidade de células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} acontecem exclusivamente no pulmão.

Estudamos as células T CD4⁺ WT e *P2rx7*^{-/-} juntas nos mesmos camundongos, eliminando qualquer interferência do microambiente que havia nos modelos utilizados anteriormente. Nos experimentos de cotransferência adotiva (infectados com MP287) e de camundongos quimeras mistas (infectados com PR8) confirmamos que somente as células T CD4⁺ WT são capazes infiltrar majoritariamente o parênquima pulmonar. A grande parte de células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} encontradas no pulmão localizam-se na vasculatura. Estes dados confirmam que a deficiência de P2RX7 em células T CD4⁺ reduz a infiltração de destas células no parênquima pulmonar.

A infecção pela cepa PR8 revelou a existência de 3 populações de células T CD4⁺ no pulmão, as quais não foram observadas na infecção por MP287: CD45iv^{hi}CD44⁺CD4⁺, CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ e CD45iv⁻CD44⁺CD4⁺. Apesar de termos analisado a frequência das populações separadamente, consideramos que as células T residentes são CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ e CD45iv⁻CD44⁺CD4⁺. Neste contexto, as células CD45iv⁺CD44⁺CD4⁺ estão iniciando o acesso ao parênquima pulmonar. Possivelmente, estas populações não foram observadas na infecção por MP287, porque nossos experimentos com este modelo foram feitos numa fase avançada da doença, onde a maior parte das células já migraram para o parênquima pulmonar.

Neste estudo descrevemos dois cenários: um relacionado ao alto número de células T CD4⁺ e outro a baixos números destas células. Podemos dizer que expressar P2RX7 em um contexto que há altas quantidades de células T CD4⁺ para migrar para o pulmão e responder à infecção pode induzir o acúmulo excessivo destas células no tecido, causando uma doença grave. Em contrapartida, num contexto em que se tem números intermediários de células T CD4⁺, a expressão de P2RX7 facilita o acesso ao tecido, gerando proteção contra a infecção sem causar dano.

Nosso próximo passo foi entender como o P2RX7 favorece o acúmulo de células T CD4⁺ no parênquima pulmonar durante a infecção por MP287 e PR8. Para

isso, avaliamos a expressão dos marcadores (CD69, CXCR3 e CX3CR1) que determinam a entrada e estabelecimento das células T CD4⁺ residentes. Dentre todos os marcadores, durante as infecções por MP287 e PR8, as células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} demonstraram baixa expressão de CXCR3 em comparação com as células WT. Na infecção pela cepa H37Rv, um dos principais receptores de quimiocina que determina o *homing* de células T CD4⁺ residentes é o CXCR3 (HOFT et al., 2019). Na infecção por MP287 demonstramos que dentre os marcadores que utilizamos, CXCR3 foi o principal para determinar o fenótipo de células T CD4⁺ residentes (CXCR3⁺CD45iv⁻). Na infecção pelo vírus Influenza as células T CD4⁺ Th1 precisam expressar CXCR3 para entrar no tecido e exercer sua função efetora (DHUME et al., 2019). Podemos concluir que a interação eATP-P2RX7 contribui para o aumento da expressão de CXCR3 em células T CD4⁺, permitindo a entrada destas células no parênquima pulmonar durante as infecções por MP287 e PR8. As análises por RNA-seq suportam nossas conclusões e demonstram que as principais diferenças moleculares entre as células T CD4⁺ WT e *P2rx7*^{-/-} estão em vias relacionadas a migração e ciclo celular.

Em relação ao ciclo celular e proliferação, nossos dados demonstraram que as células T CD4⁺ *P2rx7*^{-/-} possuem habilidade reduzida de proliferação em comparação com células T CD4⁺ WT, nos dois modelos infecciosos. O papel do P2RX7 na proliferação de células T já é bem conhecido. Schenk et al., (2018) demonstrou que o reconhecimento do eATP liberado pelos canais de Panx-1 controla a proliferação de células T. Portanto, uma vez localizadas no parênquima pulmonar, a interação eATP-P2RX7 é utilizada para o acúmulo de células T CD4⁺ residentes através da proliferação celular.

Por fim, mas não menos importante, avaliamos se o reconhecimento do eATP pelas células T CD4⁺ acontece de forma autócrina ou parácrina. Sabemos que os canais de Panx-1 participam da liberação de eATP em células ativadas e apoptóticas (CHEKENI et al., 2010; SHARMA et al., 2018). Esses canais são expressos em diversos tipos celulares, incluindo células estruturais e células imunes (MA et al., 2012). As células T CD4⁺ expressam Panx-1 e pode reconhecer via P2RX7 o eATP liberado por estes canais de forma autócrina ou parácrina. Nossos dados demonstraram que durante a infecção pelo vírus Influenza, a expressão de Panx-1 em células T não interfere no acúmulo destas células no parênquima pulmonar. Contudo, camundongos deficientes de Panx-1 em todos os tecidos possuem redução no número de células T CD4⁺ residentes. Adicionalmente, estes camundongos estão

protegidos contra a inflamação grave causada pela cepa PR8. Uma possível explicação para este resultado é que a quantidade de eATP liberado pelas células T CD4⁺ não é suficiente para controlar a sua entrada no parênquima pulmonar. No entanto, os altos níveis de eATP liberados pelas células do tecido pode ser sentido via P2RX7 pelas células T CD4⁺, ativando as vias de migração e proliferação necessárias para o acúmulo no parênquima pulmonar.

Neste trabalho demonstramos que o receptor P2RX7 controla o acúmulo das células T CD4⁺ no parênquima pulmonar, contribuindo para o agravamento das infecções por micobactéria hipervirulenta e pelo vírus Influenza. Adicionalmente, nosso grupo já demonstrou que o bloqueio farmacológico do receptor P2RX7 previne o acúmulo de células T CD4⁺ residentes, impedindo a geração de formas graves de tuberculose (SANTIAGO-CARVALHO et al., 2021). Portanto, diante dos dados discutidos neste trabalho, podemos afirmar que o estudo abre novas perspectivas de intervenções terapêuticas que visam prevenir ou reduzir o agravamento de doenças infecciosas que agridem o pulmão.

6 Conclusão

Os resultados apresentados nessa tese mostram que as células T CD4⁺ residentes, que antes eram demonstradas somente como protetoras durante infecções pulmonares, podem aumentar a gravidade destas doenças. Na infecção pulmonar grave causada pela cepa hipervirulenta *Mbv* MP287 e pelo vírus Influenza há um aumento excessivo de células T CD4⁺ residentes que desencadeiam um grave dano pulmonar. Demonstramos que a entrada e acúmulo destas células no parênquima pulmonar é controlado pelo reconhecimento parácrino do eATP (liberado através dos canais de Panx-1) pelo receptor purinérgico P2RX7 (**Figura 25**). A interação eATP-P2RX7 leva ao aumento da expressão de genes relacionados à migração e proliferação celular como: *Cxcr3* e *Mki67*. O aumento desses genes regulam o acesso e aumento do número das células T CD4⁺ no tecido e subsequente agravamento da lesão pulmonar.

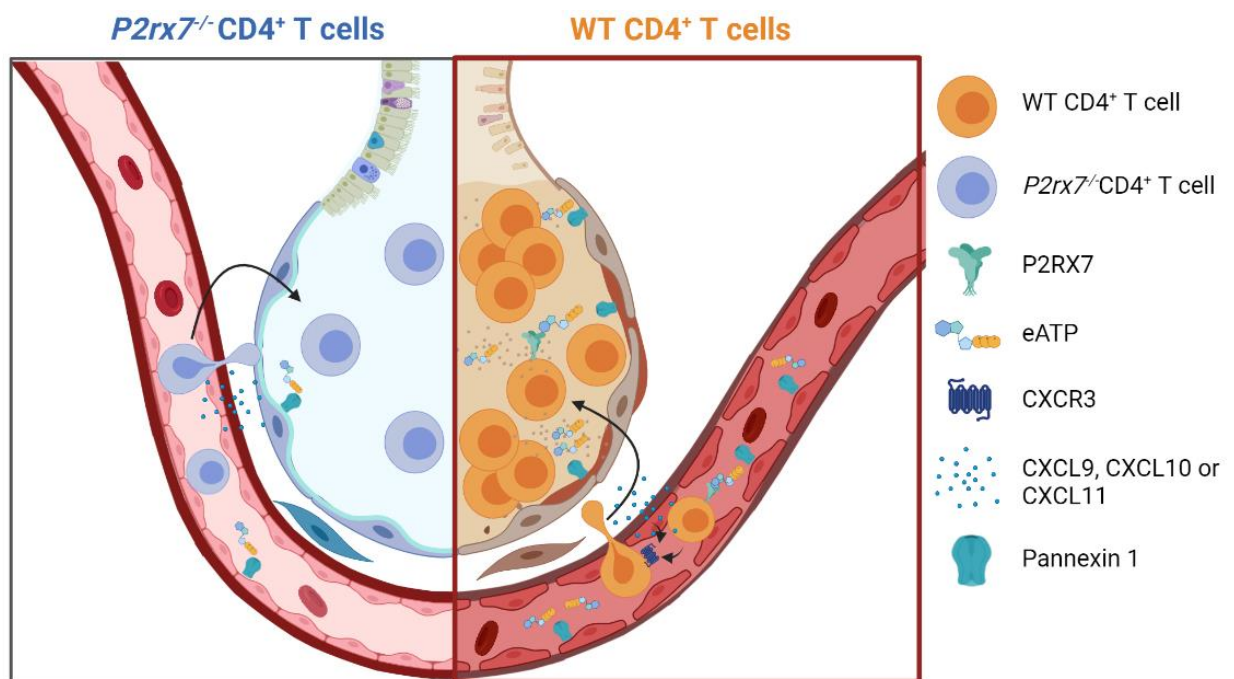


Figure 25: Ilustração esquemática mostrando o papel da interação eATP-P2RX7 na residência de células T CD4⁺ e suas implicações no agravamento de infecções pulmonares. Durante infecções pulmonares, as células T CD4⁺ expressam altos níveis de P2RX7 e podem sentir paracrinamente o eATP liberado por canais de Panx-1. A sinalização a partir da interação eATP-P2RX7 leva ao aumento da expressão de CXCR3, permitindo a entrada destas células no parênquima pulmonar. Uma vez dentro do tecido, o reconhecimento do eATP pelo P2RX7 também aumenta a proliferação das células T CD4⁺ residentes. A entrada desregulada e proliferação destas células no pulmão aumenta o dano tecidual, agravando as doenças. Created with BioRender.com.

REFERÊNCIAS

ADLER, Kenneth B.; FISCHER, Bernard M.; WRIGHT, David T.; COHN, Leah A.; BECKER, Susanne. Interactions between Respiratory Epithelial Cells and Cytokines: relationships to lung inflammation. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 725, n. 1, p. 128-145, Jul 1994.

AITANO, Andrea; JENKINS, Marc K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. **Nature Immunology**, v. 4, n. 8, p. 733-739, Aug 2003.

ALMEIDA, Fabrício M.; VENTURA, Thatiana L. B.; AMARAL, Eduardo P.; RIBEIRO, Simone C. M.; CALIXTO, Sanderson D.; MANHÃES, Marcelle R.; REZENDE, Andreza L.; SOUZAL, Giliane S.; CARVALHO, Igor S. de; SILVA, Elisangela C. Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. 0173715, Mar 2017.

ANDRADE, Felipe. Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. **Immunological Reviews**, v. 235, n. 1, p. 128-146, Apr 2010.

ANDERSON, Kristin G; MAYER-BARBER, Katrin; SUNG, Heungsup; BEURA, Lalit; JAMES, Britnie R; TAYLOR, Justin J; QUNAJ, Lindor; GRIFFITH, Thomas s; VEZYS, Vaiva; BARBER, Daniel L. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. **Nature Protocols**, v. 9, n. 1, p. 209-222, Jan 2014.

AMARAL, Eduardo P.; RIBEIRO, Simone C. M.; LANES, Verônica R.; ALMEIDA, Fabrício M.; ANDRADE, Marcelle R. M. de; BOMFIM, Caio Cesar Barbosa; SALLES, Érika M.; BORTOLUCI, Karina R.; COUTINHO-SILVA, Robson; HIRATA, Mario H. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 7, p. e1004188, Jul 2014.

ASHA, Kumari; KUMAR, Binod. Emerging Influenza D Virus Threat: what we know so far. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 2, p. 192, Feb 2019.

ASKONAS, Brigitte A.; HUMPHREY, J. H. Formation of specific antibodies and γ -globulin in vitro. A study of the synthetic ability of various tissues from rabbits immunized by different methods. **Biochemical Journal**, v. 68, n. 2, p. 252-261, 1 Feb 1958.

BARBER, Daniel L. The Helper T Cell's Dilemma in Tuberculosis. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 6, p. 655-656, Jun 2017.

BARDELLI, Monia; ALLERI, Liliana; ANGIOLINI, Francesca; BURICCHI, Francesca; TAVARINI, Simona; SAMMICHELI, Chiara; NUTI, Sandra; DEGL'INNOCENTI, Elena; ISNARDI, Isabelle; FRAGAPANE, Elena. Ex Vivo Analysis of Human Memory B Lymphocytes Specific for A and B Influenza Hemagglutinin by Polychromatic Flow-Cytometry. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. e70620, Aug 2013.

BENTEBIBEL, Salah-Eddine; KHURANA, Surender; SCHMITT, Nathalie; KURUP, Parvathi; MUELLER, Cynthia; OBERMOSER, Gerlinde; PALUCKA, A. Karolina; ALBRECHT, Randy A.; GARCIA-SASTRE, Adolfo; GOLDING, Hana. ICOS+PD-1+CXCR3+ T follicular helper cells contribute to the generation of high-avidity antibodies following influenza vaccination. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26494, May 2016.

BIANCHI, Marco E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1-5, Oct 2006.

BIENENSTOCK J. Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. **Lab Invest**, v. 28, p. 686-92, 1973.

BIENENSTOCK, J. The Lung as an Immunologic Organ. **Annual Review of Medicine**, v. 35, n. 1, p. 49-62, Feb 1984.

BIENENSTOCK, John. Gut and Bronchus Associated Lymphoid Tissue: an overview. **In Vivo Immunology**, v. 149, p. 471-477, 1982.

BODMER, Helen; OBERT, Georges; CHAN, Susan; BENOIST, Christophe; MATHIS, Diane. Environmental modulation of the autonomy of cytotoxic T lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1649-1654, Jul 1993.

BROWN, Deborah M; ROMÁN, Eulogia; SWAIN, Susan L. CD4 T cell responses to influenza infection. **Seminars In Immunology**, v. 16, n. 3, p. 171-177, Jun 2004.

BOMFIM, Caio César Barbosa; AMARAL, Eduardo Pinheiro; CASSADO, Alexandra dos Anjos; SALLES, Érika Machado; NASCIMENTO, Rogério Silva do; LASUNSKAIA, Elena; HIRATA, Mario Hiroyuki; ÁLVAREZ, José Maria; D'IMPÉRIO-LIMA, Maria Regina. P2X7 Receptor in Bone Marrow-Derived Cells Aggravates Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacterium bovis. **Frontiers In Immunology**, v. 8, p. 435, Apr 2017.

BORGES DA SILVA, Henrique; BEURA, Lalit K.; WANG, Haiguang; HANSE, Eric A.; GORE, Reshma; SCOTT, Milcah C.; WALSH, Daniel A.; BLOCK, Katharine E.; FONSECA, Raissa; YAN, Yan. The purinergic receptor P2RX7 directs metabolic fitness of long-lived memory CD8+ T cells. **Nature**, v. 559, n. 7713, p. 264-268, Jul 2018.

BORGES DA SILVA, Henrique; PENG, Changwei; WANG, Haiguang; WANHAINEN, Kelsey M.; MA, Chaoyu; LOPEZ, Sharon; KHORUTS, Alexander; ZHANG, Nu; JAMESON, Stephen C. Sensing of ATP via the Purinergic Receptor P2RX7 Promotes CD8+ Trm Cell Generation by Enhancing Their Sensitivity to the Cytokine TGF- β . **Immunity**, v. 53, n. 1, p. 158-171, Jul 2020.

BULL, C. G.; MCKEE, C. M. Respiratory immunity in rabbits. Vii. Resistance to intranasal infection in the absence of demonstrable antibodies*. **American Journal of Epidemiology**, v. 9, n. 2, p. 490-499, Mar 1929.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 16, n. 5, p.433-440, Jan 1985.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. **Acta Physiologica**, v. 195, n. 4, p. 415-447, Apr 2009.

BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B. B.; NORTH, R. A.; VERKHRATSKY, A. The birth and postnatal development of purinergic signalling. **Acta Physiologica**, v. 199, n. 2, p. 93-147, Apr 2010.

BURNSTOCK, Geoffrey; BOEYNAEMS, Jean-Marie. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 529-564, Oct 2014.

CANADAY, David H.; WILKINSON, Robert J.; LI, Qing; HARDING, Clifford V.; SILVER, Richard F.; BOOM, W. Henry. CD4+and CD8+T Cells Kill IntracellularMycobacterium tuberculosisby a Perforin and Fas/Fas Ligand-Independent Mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2734-2742, Sep 2001.

CAO, Xuetao. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 35-50, Dec 2015.

CARUSO AM, Serbina N, KLEIN E, TRIEBOLD K, BLOOM BR, FLYNN JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 162 n. 9, p. 5407-16, May 1999

CHEKENI, Faraaz B.; ELLIOTT, Michael R.; SANDILOS, Joanna K.; WALK, Scott F.; KINCHEN, Jason M.; LAZAROWSKI, Eduardo R.; ARMSTRONG, Allison J.; PENUELA, Silvia; LAIRD, Dale W.; SALVESEN, Guy S. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. **Nature**, v. 467, n. 7317, p. 863-867, Oct 2010.

CHEN, Shan Nan; ZHANG, Xiao Wen; LI, Li; RUAN, Bai Ye; HUANG, Bei; HUANG, Wen Shu; ZOU, Peng Fei; FU, Jian Ping; ZHAO, Li Juan; LI, Nan. Evolution of IFN- λ in tetrapod vertebrates and its functional characterization in green anole lizard (*Anolis carolinensis*). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 61, p. 208-224, Aug 2016.

CHEN, Xiaoyong; LIU, Shasha; GORAYA, Mohsan Ullah; MAAROUF, Mohamed; HUANG, Shile; CHEN, Ji-Long. Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 320, Mar 2018.

CLEMENS, Daniel L. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome. **Trends In Microbiology**, v. 4, n. 3, p.113-118, Mar 1996.

COOPER, A M; DALTON, D K; A STEWART, T; GRIFFIN, J P; RUSSELL, D G; ORME, I M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 178, n. 6, p. 2243-2247, Dec 1993.

COOPER, Andrea M. Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 393-422, Apr 2009.

COLLINS, Morgan K.; SHOTLAND, Abigail M.; WADE, Morgan F.; ATIF, Shaikh M.; RICHARDS, Denay K.; TORRES-LLOMPART, Manolo; MACK, Douglas G.; MARTIN, Allison K.; FONTENOT, Andrew P.; MCKEE, Amy S. A role for TNF- α in alveolar macrophage damage-associated molecular pattern release. **Jci Insight**, v. 5, n. 9, p. 1-17, May 2020.

COUTINHO-SILVA, Robson; OJCIUS, David M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. **Microbes And Infection**, v. 14, n. 14, p. 1271-1277, Nov 2012.

DADONAITE, Bernadeta; VIJAYAKRISHNAN, Swetha; FODOR, Ervin; BHELLA, David; HUTCHINSON, Edward C. Filamentous influenza viruses. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 8, p. 1755-1764, Aug 2016.

DAI, Jianli; CHEN, Yuansha; DEAN, Susan; MORRIS, J. Glenn; SALFINGER, Max; JOHNSON, Judith A. Multiple-Genome Comparison Reveals New Loci for Mycobacterium Species Identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 144-153, Jan 2011.

DARTOIS, Véronique. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 159-167, Feb 2014.

DAVIDSON, Sophia; MCCABE, Teresa M; CROTTA, Stefania; GAD, Hans Henrik; HESSEL, Edith M; BEINKE, Soren; HARTMANN, Rune; WACK, Andreas. IFN λ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFN α treatment. **Embo Molecular Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1099-1112, Aug 2016.

DEAGLIO, Silvia; DWYER, Karen M.; GAO, Wenda; FRIEDMAN, David; USHEVA, Anny; ERAT, Anna; CHEN, Jiang-Fan; ENJYOJI, Keiichii; LINDEN, Joel; OUKKA, Mohamed. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257-1265, May 2007.

DHARMAPALAN, Dhanya. Influenza. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 10, p. 828-832, Feb 2020.

DHEDA, Keertan; SCHWANDER, Stephan K.; ZHU, Bingdong; VAN ZYL-SMIT, Richard N.; ZHANG, Ying. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. **Respirology**, v. 15, n. 3, p. 433-450, Apr 2010.

DHUME, Kunal; FINN, Caroline M.; STRUTT, Tara M.; SELL, Stewart; MCKINSTRY, K. Kai. T-bet optimizes CD4 T-cell responses against influenza through CXCR3-dependent lung trafficking but not functional programming. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 5, p. 1220-1230, Jul 2019.

VIRGILIO, Francesco di; CHIOZZI, Paola; FERRARI, Davide; FALZONI, Simonetta; SANZ, Juana M.; MORELLI, Anna; TORBOLI, Maurizia; BOLOGNESI, Giorgio; BARICORDI, O. Roberto. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587-600, Feb 2001.

DI VIRGILIO F. P2X receptors and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**. V. 22, n. 7, p. 866-77, 2015.

DI VIRGILIO, Francesco; BEN, Diego dal; SARTI, Alba Clara; GIULIANI, Anna Lisa; FALZONI, Simonetta. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 47, n. 1, p. 15-31, Jul 2017.

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart¹. **The Journal of Physiology**, v. 68, n. 3, p.213-237, Nov 1929.

EHRE, C.; WORTHINGTON, E. N.; LIESMAN, R. M.; GRUBB, B. R.; BARBIER, D.; O'NEAL, W. K.; SALLENAVE, J.-M.; PICKLES, R. J.; BOUCHER, R. C. Overexpressing mouse model demonstrates the protective role of Muc5ac in the lungs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 41, p. 16528-16533, Sep 2012.

ERNST, Joel D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 581-591, 13 Jul 2012.

FAN, Zhi-Dan; ZHANG, Ya-Yuan; GUO, Yi-Hong; HUANG, Na; MA, Hui-Hui; HUANG, Hui; YU, Hai-Guo. Involvement of P2X7 receptor signaling on regulating the differentiation of Th17 cells and type II collagen-induced arthritis in mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35804, Oct 2016.

FERRAZ, J.C.; MELO, F.B.s.; ALBUQUERQUE, M.F.P.M.; MONTENEGRO, S.M.L.; ABATH, F.G.C. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1387-1397, Nov 2006.

FONTANA, J.; CARDONE, G.; HEYMANN, J. B.; WINKLER, D. C.; STEVEN, A. C. Structural Changes in Influenza Virus at Low pH Characterized by Cryo-Electron Tomography. **Journal of Virology**, v. 86, n. 6, p. 2919-2929, Jan 2012.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; TRIEBOLD, K. J.; KOLLER, B.; BLOOM, B. R. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 24, p. 12013-12017, Dec 1992.

FLYNN, Joanne L.; GOLDSTEIN, Marsha M.; CHAN, John; TRIEBOLD, Karla J.; PFEFFER, Klaus; LOWENSTEIN, Charles J.; SCHRELBER, Robert; MAK, Tak W.; BLOOM, Barry R. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against mycobacterium tuberculosis in mice. **Immunity**, v. 2, n. 6, p. 561-572, Jun 1995.

FLYNN, J L; CHAN, J; TRIEBOLD, K J; DALTON, D K; A STEWART, T; BLOOM, B R. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 178, n. 6, p. 2249-2254, Dec 1993.
FRASCA, Daniela; DIAZ, Alain; ROMERO, Maria; BLOMBERG, Bonnie B. The generation of memory B cells is maintained, but the antibody response is not, in the elderly after repeated influenza immunizations. **Vaccine**, v. 34, n. 25, p. 2834-2840, May 2016.

GALL, Sylvain M. Le; BOBÉ, Pierre; REISS, Karina; HORIUCHI, Keisuke; NIU, Xiao-Da; LUNDELL, Daniel; GIBB, David R.; CONRAD, Daniel; SAFTIG, Paul; BLOBEL, Carl P. ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins Such as Transforming Growth Factor α , L-Selectin, and Tumor Necrosis Factor α . **Molecular Biology of The Cell**, v. 20, n. 6, p. 1785-1794, Mar 2009.

GAUTAM, Uma S.; FOREMAN, Taylor W.; BUCSAN, Allison N.; VEATCH, Ashley V.; ALVAREZ, Xavier; ADEKAMBI, Toidi; GOLDEN, Nadia A.; GENTRY, Kaylee M.; DOYLE-MEYERS, Lara A.; RUSSELL-LODRIGUE, Kasi E.. In vivo inhibition of tryptophan catabolism reorganizes the tuberculoma and augments immune-mediated control of Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy Of Sciences**, v. 115, n. 1, p. 62-71, Dec 2017.

GEURTSVANKESSEL, Corine H.; WILLART, Monique A.M.; VAN RIJT, Leonie S.; MUSKENS, Femke; KOOL, Mirjam; BAAS, Chantal; THIELEMANS, Kris; BENNETT, Clare; CLAUSEN, Björn E.; HOOGSTEDEN, Henk C. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 7, p. 1621-1634, Jun 2008.

GHEBREHEWET, Sam; MACPHERSON, Peter; HO, Antonia. Influenza. **Bmj**, p. i6258, Dec 2016.

GLICKMAN, Michael S.; JACOBS, William R. Microbial Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 477-485, Feb 2001.

GOUBAU, Delphine; SCHLEE, Martin; DEDDOUCHE, Safia; PRUIJSSERS, Andrea J.; ZILLINGER, Thomas; GOLDECK, Marion; SCHUBERTH, Christine; VEEN, Annemarte G. van Der; FUJIMURA, Tsutomu; REHWINKEL, Jan. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. **Nature**, v. 514, n. 7522, p. 372-375, Aug 2014.

GOPLEN, Nick P.; WU, Yue; SON, Young Min; LI, Chaofan; WANG, Zheng; CHEON, In Su; JIANG, Li; ZHU, Bibo; AYASOUFI, Katayoun; CHINI, Eduardo N. Tissue-resident CD8+ T cells drive age-associated chronic lung sequelae after viral pneumonia. **Science Immunology**, v. 5, n. 53, p. 4557, Nov 2020.

GORDON, J L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. **Biochemical Journal**, v. 233, n. 2, p.309-319, Jan 1986.

GRASSI, Fabio. The P2X7 Receptor as Regulator of T Cell Development and Function. **Frontiers In Immunology**, v. 11, p. 1179, Jun 2020.

GUO, Hailong; KUMAR, Pawan; MALARKANNAN, Subramaniam. Evasion of natural killer cells by influenza virus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 2, p. 189-194, Aug. 2010.

HINTZEN, Gabriele; OHL, Lars; RIO, Maria-Luisa del; RODRIGUEZ-BARBOSA, Jose-Ignacio; PABST, Oliver; KOCKS, Jessica R.; KREGGE, Janet; HARDTKE, Svenja;

FÖRSTER, Reinhold. Induction of Tolerance to Innocuous Inhaled Antigen Relies on a CCR7-Dependent Dendritic Cell-Mediated Antigen Transport to the Bronchial Lymph Node. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 7346-7354, Nov 2006.

HISCOTT, John; LIN, Rongtuan; NAKHAEI, Peyman; PAZ, Suzanne. MasterCARD: a priceless link to innate immunity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 53-56, Feb 2006.

HOFT, Stella G.; SALLIN, Michelle A.; KAUFFMAN, Keith D.; SAKAI, Shunsuke; GANUSOV, Vitaly V.; BARBER, Daniel L. The Rate of CD4 T Cell Entry into the Lungs during Mycobacterium tuberculosis Infection Is Determined by Partial and Opposing Effects of Multiple Chemokine Receptors. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 6, p. 00841-18, Jun 2019.

HUNTER, Robert L. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. **Tuberculosis**, v. 91, n. 6, p. 497-509, Nov 2011.

IDZKO, Marco; HAMMAD, Hamida; VAN NIMWEGEN, Menno; KOOL, Mirjam; WILLART, Monique A M; MUSKENS, Femke; HOOGSTEDEN, Henk C; LUTTMANN, Werner; FERRARI, Davide; VIRGILIO, Francesco di. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 13, n. 8, p. 913-919, Jul 2007.

JANIN, Yves L. Antituberculosis drugs: ten years of research. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 2479-2513, Apr 2007.

JENNRICH, S.; LEE, M. H.; LYNN, R. C.; DEWBERRY, K.; DEBES, G. F. Tissue Exit: a novel control point in the accumulation of antigen-specific cd8 t cells in the influenza a virus-infected lung. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3436-3445, Jan 2012.

JIANG, Jiu; FISHER, Erin M.; MURASKO, Donna M. CD8 T cell responses to influenza virus infection in aged mice. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 4, p. 422-427, Feb 2011.

JOSEPH, Udayan; SU, Yvonne C. F.; VIJAYKRISHNA, Dhanasekaran; SMITH, Gavin J. D. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 11, n. 1, p. 74-84, 8 ago. 2016.

JUNGER, W. G. Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 16, p. 2528-2540, May 2008.

KAUFMANN, Stefan H.e. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 1, p. 20-30, Oct 2001.

KALIL, Andre C.; THOMAS, Paul G. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 258, Jul 2019.
KHADER, Shabaana A.; COOPER, Andrea M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p. 79-83, Feb 2008.

KIM, Sujin; KIM, Min-Ji; KIM, Chang-Hoon; KANG, Ju Wan; SHIN, Ha Kyung; KIM, Dong-Young; WON, Tae-Bin; HAN, Doo Hee; RHEE, Chae Seo; YOON, Joo-Heon. The Superiority of IFN-lambda as a Therapeutic Candidate to Control Acute Influenza Viral Lung Infection. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, p. 202-212, Sep 2016.

KIMURA, Shunsuke; MUTOH, Mami; HISAMOTO, Meri; SAITO, Hikaru; TAKAHASHI, Shun; ASAKURA, Takanori; ISHII, Makoto; NAKAMURA, Yutaka; IIDA, Junichiro; HASE, Koji. Airway M Cells Arise in the Lower Airway Due to RANKL Signaling and Reside in the Bronchiolar Epithelium Associated With iBALT in Murine Models of Respiratory Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1323, Jun 2019.

KOUL, Anil; ARNOULT, Eric; LOUNIS, Nacer; GUILLEMONT, Jerome; ANDRIES, Koen. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483-490, Jan 2011.

KRAMMER, Florian; SMITH, Gavin J. D.; FOUCHIER, Ron A. M.; PEIRIS, Malik; KEDZIERSKA, Katherine; DOHERTY, Peter C.; PALESE, Peter; SHAW, Megan L.; TREANOR, John; WEBSTER, Robert G. Influenza. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 3, Jun 2018.

KREIJTZ, J.H.C.M.; FOUCHIER, R.A.M.; RIMMELZWAAN, G.F. Immune responses to influenza virus infection. **Virus Research**, v. 162, n. 1-2, p. 19-30, Dec. 2011.

KUMAR, Ashwani; FARHANA, Aisha; GUIDRY, Loni; SAINI, Vikram; HONDALUS, Mary; STEYN, Adrie J.C. Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control?. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, p. 2615-2639, Dec 2011.

LAGRUTA, Nicole L.; TURNER, Stephen J.T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 8, p. 396-402, Aug 2014.

LAMB, J. R., D. D. Eckels, PH LAKE, A. H. Johnson, R. J. HARTZMAN, and J. N. WOODY. Antigen-specific human T lymphocyte clones: induction, antigen specificity, and MHC restriction of influenza virus-immune clones. **The Journal of Immunology**, v.128, n. 1, p. 233-238, Jan 1982.

LAMB, A. Paramyxoviridae: the virus and their replication. **Fields Virology**. 1996.

LASUNSKAIA, Elena B.; CAMPOS, Mariana N. N.; ANDRADE, Marcelle R. M. de; DAMATTA, Renato A.; KIPNIS, Thereza L.; EINICKER-LAMAS, Marcelo; SILVA, Wilmar D. da. Mycobacteria directly induce cytoskeletal rearrangements for macrophage spreading and polarization through TLR2-dependent PI3K signaling. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1480-1490, Sep 2006.

LEE, Benjamin H.; HWANG, David M.; PALANIYAR, Nades; GRINSTEIN, Sergio; PHILPOTT, Dana J.; HU, Jim. Activation of P2X7 Receptor by ATP Plays an Important Role in Regulating Inflammatory Responses during Acute Viral Infection. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. e35812, Apr 2012.

LEYVA-GRADO, Victor H.; ERMLER, Megan E.; SCHOTSAERT, Michael; GONZALEZ, Ma G.; GILLESPIE, Virginia; LIM, Jean K.; GARCÍA-SASTRE, Adolfo. Contribution of the Purinergic Receptor P2X7 to Development of Lung Immunopathology during Influenza Virus Infection. **Mbio**, v. 8, n. 2, p. 00229, May 2017.

LI, Yao-Tsun; LINSTER, Martin; MENDENHALL, Ian H; SU, Yvonne C F; SMITH, Gavin J D. Avian influenza viruses in humans: lessons from past outbreaks. **British Medical Bulletin**, v. 132, n. 1, p. 81-95, Dec 2019.

LIEM, Karel F. Form and Function of Lungs: the evolution of air breathing mechanisms. **American Zoologist**, v. 28, n. 2, p. 739-759, May 1988.

LIN, Philana Ling; RUTLEDGE, Tara; GREEN, Angela M.; BIGBEE, Matthew; FUHRMAN, Carl; KLEIN, Edwin; FLYNN, Joanne L. CD4 T Cell Depletion Exacerbates Acute *Mycobacterium tuberculosis* While Reactivation of Latent Infection Is Dependent on Severity of Tissue Depletion in Cynomolgus Macaques. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 12, p. 1693-1702, Dec 2012.

LIPMANN, Fritz. Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy. *Advances In Enzymology - And Related Areas of Molecular Biology*, p.99-162, Nov 2006. John Wiley & Sons, Inc. MADIGAN, MICHAEL T. 12^a edição. *Microbiologia* LIPSCOMB, Mary F.; BICE, David E.; LYONS, C. Richard; SCHUYLER, Mark R.; WILKES, David. The Regulation of Pulmonary Immunity. **Advances In Immunology**, p. 369-455, Jan 1995.

LOTZE, Michael T.; ZEH, Herbert J.; RUBARTELLI, Anna; SPARVERO, Louis J.; AMOSCATO, Andrew A.; WASHBURN, Newell R.; DEVERA, Michael E.; LIANG, Xiaoyan; TÖR, Mahmut; BILLIAR, Timothy. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. **Immunological Reviews**, v. 220, n. 1, p. 60-81, Dez 2007.

LIU, Y; A JANEWAY, C. Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 172, n. 6, p. 1735-1739, Dec 1990.

MA, Weihong; COMPAN, Vincent; ZHENG, Wenxuan; MARTIN, Elizabeth; NORTH, R. Alan; VERKHRATSKY, Alexei; SURPRENANT, Annmarie. Pannexin 1 forms an anion-selective channel. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 463, n. 4, p. 585-592, Feb 2012.

MEDINA, Christopher B.; CHIU, Yu-Hsin; STREMSKA, Marta E.; LUCAS, Christopher D.; POON, Ivan; TUNG, Kenneth S.; ELLIOTT, Michael R.; DESAI, Bimal; LORENZ, Ulrike M.; BAYLISS, Douglas A. Pannexin 1 channels facilitate communication between T cells to restrict the severity of airway inflammation. **Immunity**, v. 54, n. 8, p. 1715-1727, Aug 2021.

MEHRA, Smriti; ALVAREZ, Xavier; DIDIER, Peter J.; DOYLE, Lara A.; BLANCHARD, James L.; LACKNER, Andrew A.; KAUSHAL, Deepak. Granuloma Correlates of

Protection Against Tuberculosis and Mechanisms of Immune Modulation by Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 7, p. 1115-1127, 18 Dec 2012.

MEYER, Keith C. The role of immunity in susceptibility to respiratory infection in the aging lung. **Respiration Physiology**, v. 128, n. 1, p. 23-31, Oct 2001.

MISHRA, Amarjit; GUO, Yujie; ZHANG, Li; MORE, Sunil; WENG, Tingting; CHINTAGARI, Narendranath Reddy; HUANG, Chaoqun; LIANG, Yurong; PUSHPARAJ, Samuel; GOU, Deming. A Critical Role for P2X7 Receptor–Induced VCAM-1 Shedding and Neutrophil Infiltration during Acute Lung Injury. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 7, p. 2828-2837, Aug 2016.

MIYATA, Ryohei; VAN EEDEN, Stephan F. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 257, n. 2, p. 209-226, Dec 2011.

MOZDZANOWSKA, Krystyna; FURCHNER, Michelle; MAIESE, Krista; GERHARD, Walter. CD4+T Cells Are Ineffective in Clearing a Pulmonary Infection with Influenza Type A Virus in the Absence of B Cells. **Virology**, v. 239, n. 1, p. 217-225, Dec 1997.

MOZDZANOWSKA, Krystyna; MAIESE, Krista; GERHARD, Walter. Th Cell-Deficient Mice Control Influenza Virus Infection More Effectively Than Th- and B Cell-Deficient Mice: evidence for a th-independent contribution by b cells to virus clearance. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 2635-2643, Mar 2000.

MCAULEY, J L; CORCILIOUS, L; TAN, H-X; PAYNE, R J; A MCGUCKIN, M; BROWN, L e. The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 6, p. 1581-1593, Mar 2017.

MCDERMOTT, M.R.; BEFUS, A.D.; BIENENSTOCK, J. The structural basis for immunity in the respiratory tract. **International Review of Experimental Pathology**, v. 23, p. 47-112, 1982.

MOGUES, Tirsit; GOODRICH, Mariam E.; RYAN, Lynn; LACOURSE, Ronald; NORTH, Robert J. The Relative Importance of T Cell Subsets in Immunity and Immunopathology of Airborne Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 193, n. 3, p. 271-280, Jan 2001.

MSTRUP, Jan; NOVAK, Ivana. P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. **Biochemical Journal**, v. 374, n. 1, p. 51-61, Aug 2003.

NUNES-ALVES, Cláudio; BOOTY, Matthew G.; CARPENTER, Stephen M.; JAYARAMAN, Pushpa; ROTHCHILD, Alissa C.; BEHAR, Samuel M. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289-299, Mar. 2014.

NUNN, Paul; WILLIAMS, Brian; FLOYD, Katherine; DYE, Christopher; ELZINGA, Gijs; RAVIGLIONE, Mario. Tuberculosis control in the era of HIV. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 819-826, Oct 2005.

ORME, Ian M.T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. **Journal of Immunology**, v. 148, p.189-196, 1992.

ORME, Ian M. Development of new vaccines and drugs for TB: limitations and potential strategic errors. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 161-177, Feb 2011.

ORME, Ian M.; BASARABA, Randall J. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. **Seminars In Immunology**, v. 26, n. 6, p. 601-609, Dec 2014.

O'GARRA, Anne; REDFORD, Paul S.; MCNAB, Finlay W.; BLOOM, Chloe I.; WILKINSON, Robert J.; BERRY, Matthew P.R. The Immune Response in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 475-527, Mar 2013.

OTTENHOFF, Tom H.M; KUMARARATNE, Dinakantha; CASANOVA, Jean-Laurent. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunology Today**, v. 19, n. 11, p. 491-494, Nov 1998.

OTTENHOFF, Tom H. M.; KAUFMANN, Stefan H. E. Vaccines against Tuberculosis: where are we and where do we need to go?. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 5, p. 1002607, May 2012.

OUYANG, Jing; ZHU, Xiaomei; CHEN, Yuhai; WEI, Haitao; CHEN, Qinghuang; CHI, Xiaojuan; QI, Baomin; ZHANG, Lianfeng; ZHAO, Yi; GAO, George Fu. NRAV, a Long Noncoding RNA, Modulates Antiviral Responses through Suppression of Interferon-Stimulated Gene Transcription. **Cell Host & Microbe**, v. 16, n. 5, p. 616-626, Nov 2014.

PARK, Jae Seuk; TAMAYO, Marcela Henao; GONZALEZ-JUARRERO, Mercedes; ORME, Ian M.; ORDWAY, Diane J. Virulent clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 1, p. 80-86, Nov 2005.

PIANTA, C.; CAMPOS, R. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999 – **Brasil. Boletim da Saúde**. V. 15, n. 1, p. 61-71, 2001.

PIETERS, Jean. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. **Microbes And Infection**, v. 3, n. 3, p. 249-255, Mar 2001.

PICHLMAIR, Andreas; SCHULZ, Oliver; TAN, Choon Ping; NÄSLUND, Tanja I.; LILJESTRÖM, Peter; WEBER, Friedemann; SOUSA, Caetano Reis e. RIG-I-Mediated

Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 997-1001, Nov 2006.

PIZZOLLA, Angela; NGUYEN, Thi H. O.; SMITH, Jeffrey M.; BROOKS, Andrew G.; KEDZIERSKA, Katherine; HEATH, William R.; READING, Patrick C.; WAKIM, Linda M. Resident memory CD8⁺ T cells in the upper respiratory tract prevent pulmonary influenza virus infection. **Science Immunology**, v. 2, n. 12, p. 6970, Jan 2017.

POTTER, C.W. A history of influenza. **Journal Of Applied Microbiology**. v. 91, n. 4, p. 572-9, Oct 2001.

RAVIMOHAN, Shruthi; KORNFELD, Hardy; WEISSMAN, Drew; BISSON, Gregory P. Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. **European Respiratory Review**, v. 27, n. 147, p. 170077, 28 Feb 2018.

REILEY, W. W.; SHAFIANI, S.; WITTMER, S. T.; TUCKER-HEARD, G.; MOON, J. J.; JENKINS, M. K.; URDAHL, K. B.; WINSLOW, G. M.; WOODLAND, D. L. Distinct functions of antigen-specific CD4 T cells during murine Mycobacterium tuberculosis infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 45, p. 19408-19413, Oct 2010.

RIBEIRO, S. C. M.; GOMES, L. L.; AMARAL, E. P.; ANDRADE, M. R. M.; ALMEIDA, F. M.; REZENDE, A. L.; LANES, V. R.; CARVALHO, E. C. Q.; SUFFYS, P. N.; MOKROUSOV, I. Mycobacterium tuberculosis Strains of the Modern Sublineage of the Beijing Family Are More Likely to Display Increased Virulence than Strains of the Ancient Sublineage. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2615-2624, 14 May 2014.

RICHMOND, I; PRITCHARD, G e; ASHCROFT, T; A AVERY; A CORRIS, P; WALTERS, E H. Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers. **Thorax**, v. 48, n. 11, p. 1130-1134, Nov 1993.

RIVAS-YÁÑEZ, Elizabeth; BARRERA-AVALOS, Carlos; PARRA-TELLO, Brian; BRICEÑO, Pedro; ROSEMBLATT, Mariana V.; SAAVEDRA-ALMARZA, Juan; ROSEMBLATT, Mario; ACUÑA-CASTILLO, Claudio; BONO, María Rosa; SAUMA, Daniela. P2X7 Receptor at the Crossroads of T Cell Fate. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4937, Jul 2020.

ROY, Michelle G.; LIVRAGHI-BUTRICO, Alessandra; FLETCHER, Ashley A.; MCELWEE, Melissa M.; EVANS, Scott E.; BOERNER, Ryan M.; ALEXANDER, Samantha N.; BELLINGHAUSEN, Lindsey K.; SONG, Alfred S.; PETROVA, Youlia M. Muc5b is required for airway defence. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 412-416, Dec. 2013.

SAKAI, Shunsuke; KAUFFMAN, Keith D.; SCHENKEL, Jason M.; MCBERRY, Cortez C.; MAYER-BARBER, Katrin D.; MASOPUST, David; BARBER, Daniel L. Cutting Edge: control of mycobacterium tuberculosis infection by a subset of lung parenchyma: homing cd4 t cells. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 7, p. 2965-2969, Mar 2014.

SALLES, Érika Machado de; MENEZES, Maria Nogueira de; SIQUEIRA, Renan; SILVA, Henrique Borges da; AMARAL, Eduardo Pinheiro; CASTILLO-MÉNDEZ, Sheyla Inés; CUNHA, Isabela; CASSADO, Alexandra dos Anjos; VIEIRA, Flávia Sarmiento; OLIVIERI, David Nicholas. P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. **Plos Pathogens**, v. 13, n. 8, p. e1006595, 31 Aug. 2017.

SALLIN, Michelle A.; SAKAI, Shunsuke; KAUFFMAN, Keith D.; YOUNG, Howard A.; ZHU, Jinfang; BARBER, Daniel L. Th1 Differentiation Drives the Accumulation of Intravascular, Non-protective CD4 T Cells during Tuberculosis. **Cell Reports**, v. 18, n. 13, p. 3091-3104, Mar 2017.

SAUNDERS; FRANK; ORME. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**, v. 98, n. 3, p. 324-328, Nov 1999.

SAUTTO, Giuseppe A.; KIRCHENBAUM, Greg A.; ROSS, Ted M. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 17, Jan 2018.

SATO, A.T.; Basic and clinical aspects of bronchus-associated lymphoid tissue. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. **The Journal of the Japanese Respiratory Society**. V. 1, n.38, p. 3-11, Jan 2000.

SATO, Sachiko; ST-PIERRE, Christian; BHAUMIK, Pampa; NIEMINEN, Julie. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble β -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (damps) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (pamps). **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 172-187, Jul 2009.

SCHENK, Ursula; FRASCOLI, Michela; PROIETTI, Michele; GEFFERS, Robert; TRAGGIALI, Elisabetta; BUER, Jan; RICORDI, Camillo; WESTENDORF, Astrid M.; GRASSI, Fabio. ATP Inhibits the Generation and Function of Regulatory T Cells Through the Activation of Purinergic P2X Receptors. **Science Signaling**, v. 4, n. 162, p. ra12-ra12, Mar 2011.

SCHENK, Ursula; WESTENDORF, Astrid M.; RADAELLI, Enrico; CASATI, Anna; FERRO, Micol; FUMAGALLI, Marta; VERDERIO, Claudia; BUER, Jan; SCANZIANI, Eugenio; GRASSI, Fabio. Purinergic Control of T Cell Activation by ATP Released Through Pannexin-1 Hemichannels. **Science Signaling**, v. 1, n. 39, p. 6, Sep 2008.

SEIBERT, C. W.; RAHMAT, S.; KRAUSE, J. C.; EGGINK, D.; ALBRECHT, R. A.; GOFF, P. H.; KRAMMER, F.; DUTY, J. A.; BOUVIER, N. M.; GARCIA-SASTRE, A. Recombinant IgA Is Sufficient to Prevent Influenza Virus Transmission in Guinea Pigs. **Journal of Virology**, v. 87, n. 14, p. 7793-7804, May 2013.

SEMAN, Michel; ADRIOUCH, Sahil; SCHEUPLEIN, Felix; KREBS, Christian; FREESE, Dunja; GLOWACKI, Gustavo; DETERRE, Phillipe; HAAG, Friedrich; KOCH-NOLTE, Friedrich. NAD-Induced T Cell Death. **Immunity**, v. 19, n. 4, p. 571-582, Oct 2003.

SHARMA, Ashish K.; CHARLES, Eric J.; ZHAO, Yunge; NARAHARI, Adishesh K.; BADERDINNI, Pranav K.; GOOD, Miranda E.; LORENZ, Ulrike M.; KRON, Irving L.; BAYLISS, Douglas A.; RAVICHANDRAN, Kodi S. Pannexin-1 channels on endothelial cells mediate vascular inflammation during lung ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, v. 315, n. 2, p. 301-312, 1 ago. 2018.

SIA, Jonathan Kevin; RENGARAJAN, Jyothi. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, p. 4-7, Ago 2019. American Society for Microbiology.

SON, Young Min; CHEON, In Su; WU, Yue; LI, Chaofan; WANG, Zheng; GAO, Xiaochen; CHEN, Yao; TAKAHASHI, Yoshimasa; FU, Yang-Xin; DENT, Alexander L. Tissue-resident CD4+ T helper cells assist the development of protective respiratory B and CD8+ T cell memory responses. **Science Immunology**, v. 6, n. 55, p. eabb6852, Jan 2021.

SUN, Xiangjie; WHITTAKER, Gary R. Entry of Influenza Virus. **Viral Entry into Host Cells**, p. 72-82, 2006.

SUN, Jie; MADAN, Rajat; KARP, Christopher L; BRACIALE, Thomas J. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. **Nature Medicine**, v. 15, n. 3, p. 277-284, Feb 2009.

SWARNALEKHA, Nivedya; SCHREINER, David; LITZLER, Ludivine C.; IFTIKHAR, Saadia; KIRCHMEIER, Daniel; KÜNZLI, Marco; SON, Young Min; SUN, Jie; MOREIRA, Etori Aguiar; KING, Carolyn G. T resident helper cells promote humoral responses in the lung. **Science Immunology**, v. 6, n. 55, p. eabb6808, Jan 2021.

TAKESHITA, Fumihiko; TANAKA, Toshiyuki; MATSUDA, Tomoko; TOZUKA, Miyuki; KOBIYAMA, Kouji; SAHA, Sukumar; MATSUI, Kiyohiko; ISHII, Ken J.; COBAN, Cevayir; AKIRA, Shizuo. Toll-Like Receptor Adaptor Molecules Enhance DNA-Raised Adaptive Immune Responses against Influenza and Tumors through Activation of Innate Immunity. **Journal of Virology**, v. 80, n. 13, p. 6218-6224, Jul 2006.

TAYLOR, Simon R. J.; GONZALEZ-BEGNE, Mireya; DEWHURST, Stephen; CHIMINI, Giovanna; HIGGINS, Christopher F.; MELVIN, James E.; ELLIOTT, James I. Sequential Shrinkage and Swelling Underlie P2X7-Stimulated Lymphocyte Phosphatidylserine Exposure and Death. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 1, p. 300-308, Dec 2007.

THOMPSON, William W.; SHAY, David K.; WEINTRAUB, Eric; BRAMMER, Lynnette; COX, Nancy; ANDERSON, Larry J.; FUKUDA, Keiji. Mortality Associated with Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States. **Jama**, v. 289, n. 2, p. 179, Jan 2003.

THÜSEN, Jan von Der; EERDEN, Menno. Histopathology and genetic susceptibility in COVID-19 pneumonia. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 7, p. e13259, Jun 2020.

TORRADO, Egídio; ROBINSON, Richard T.; COOPER, Andrea M. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. **Trends In Immunology**, v. 32, n. 2, p. 66-72, Feb 2011.

TORTORA, G. J. Princípios de Anatomia e Fisiologia Humana. 14 ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2018.

TUMPEY, Terrence M.; GARCÍA-SASTRE, Adolfo; TAUBENBERGER, Jeffery K.; PALESE, Peter; SWAYNE, David E.; PANTIN-JACKWOOD, Mary J.; SCHULTZ-CHERRY, Stacey; SOLÓRZANO, Alicia; VAN ROOIJEN, Nico; KATZ, Jacqueline M. Pathogenicity of Influenza Viruses with Genes from the 1918 Pandemic Virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. **Journal of Virology**, v. 79, n. 23, p. 14933-14944, Dec 2005.

TRABULSI, L.R. 5ª edição. **Microbiologia Atheneu**, 2008.

TRIPP, Ralph A., SALLY R. SARAWAR, and PETER C. Doherty. "Characteristics of the influenza virus-specific CD8+ T cell response in mice homozygous for disruption of the H-2IAb gene." **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 2955-2959, Sep 1995.
TOPHAM, David J.; DOHERTY, Peter C. Clearance of an Influenza A Virus by CD4 + T Cells Is Inefficient in the Absence of B Cells. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 882-885, Jan 1998.

VAN CREVEL, Reinout; OTTENHOFF, Tom H. M.; MEER, Jos W. M. van Der. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 294-309, Apr 2002.

VAN DOMSELAAR, Robert; BOVENSCHEN, Niels. Cell death-independent functions of granzymes: hit viruses where it hurts. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 5, p. 301-314, Jun 2011.

VIGNALI, Dario A. A.; COLLISON, Lauren W.; WORKMAN, Creg J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523-532, Jul 2008.

XIE, Q.W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 7, p. 4705-4708, Feb 1994.

XU, Rui; MCBRIDE, Ryan; PAULSON, James C.; BASLER, Christopher F.; WILSON, Ian A. Structure, Receptor Binding, and Antigenicity of Influenza Virus Hemagglutinins from the 1957 H2N2 Pandemic. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 1715-1721, Feb 2010.

ZHANG, Ying; POST-MARTENS, Katrin; DENKIN, Steven. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 1-2, p. 21-27, Jan 2006.

ZHANG, Chengfei; HE, Hongwang; WANG, Li; ZHANG, Na; HUANG, Hongjun; XIONG, Qingqing; YAN, Yan; WU, Nannan; REN, Hua; HAN, Honghui. Virus-Triggered

ATP Release Limits Viral Replication through Facilitating IFN- β Production in a P2X7-Dependent Manner. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 4, p. 1372-1381, Jul 2017.

ZHAO, Yan; ZHANG, Yong-Hong; DENNEY, Laura; YOUNG, Duncan; POWELL, Tim J.; PENG, Yan-Chun; LI, Ning; YAN, Hui-Ping; WANG, Da-Yan; SHU, Yue-Long. High Levels of Virus-Specific CD4+T Cells Predict Severe Pandemic Influenza A Virus Infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 12, p. 1292-1297, Dec 2012.

ZENS, Kyra D.; FARBER, Donna L. Memory CD4 T Cells in Influenza. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 399-421, 2014.

WANG, Chihui Mary; PLOIA, Cristina; ANSELMINI, Fabio; SARUKHAN, Adelaida; VIOLA, Antonella. Adenosine triphosphate acts as a paracrine signaling molecule to reduce the motility of T cells. **The Embo Journal**, v. 33, n. 12, p. 1354-1364, May 2014.

WAKIM, L M; SMITH, J; CAMINSCHI, I; LAHOUD, M H; A VILLADANGOS, J. Antibody-targeted vaccination to lung dendritic cells generates tissue-resident memory CD8 T cells that are highly protective against influenza virus infection. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 5, p. 1060-1071, Jan 2015.

WEI, Haitao; WANG, Song; CHEN, Qinghuang; CHEN, Yuhai; CHI, Xiaojuan; ZHANG, Lianfeng; HUANG, Shile; GAO, George F.; CHEN, Ji-Long. Suppression of Interferon Lambda Signaling by SOCS-1 Results in Their Excessive Production during Influenza Virus Infection. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003845, Jan 2014.

WHITMIRE, Jason K.; TAN, Joyce T.; WHITTON, J. Lindsay. Interferon- γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1053-1059, Apr 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2021) Global Tuberculosis Report 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2020) Global Tuberculosis Report 2019.

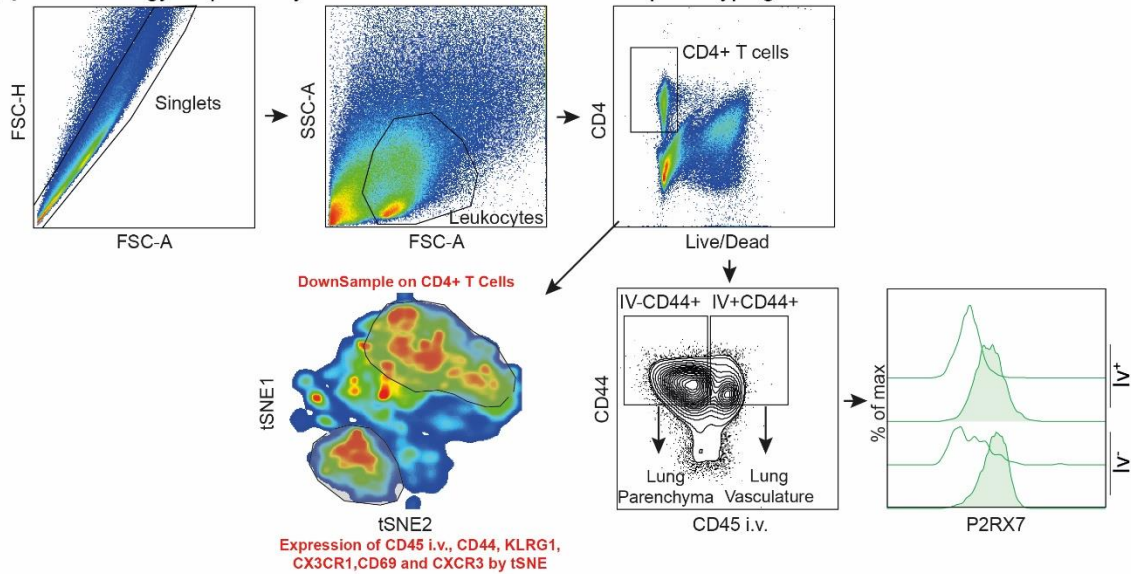
WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019) Global Tuberculosis Report 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015) Global Tuberculosis Report 2014.

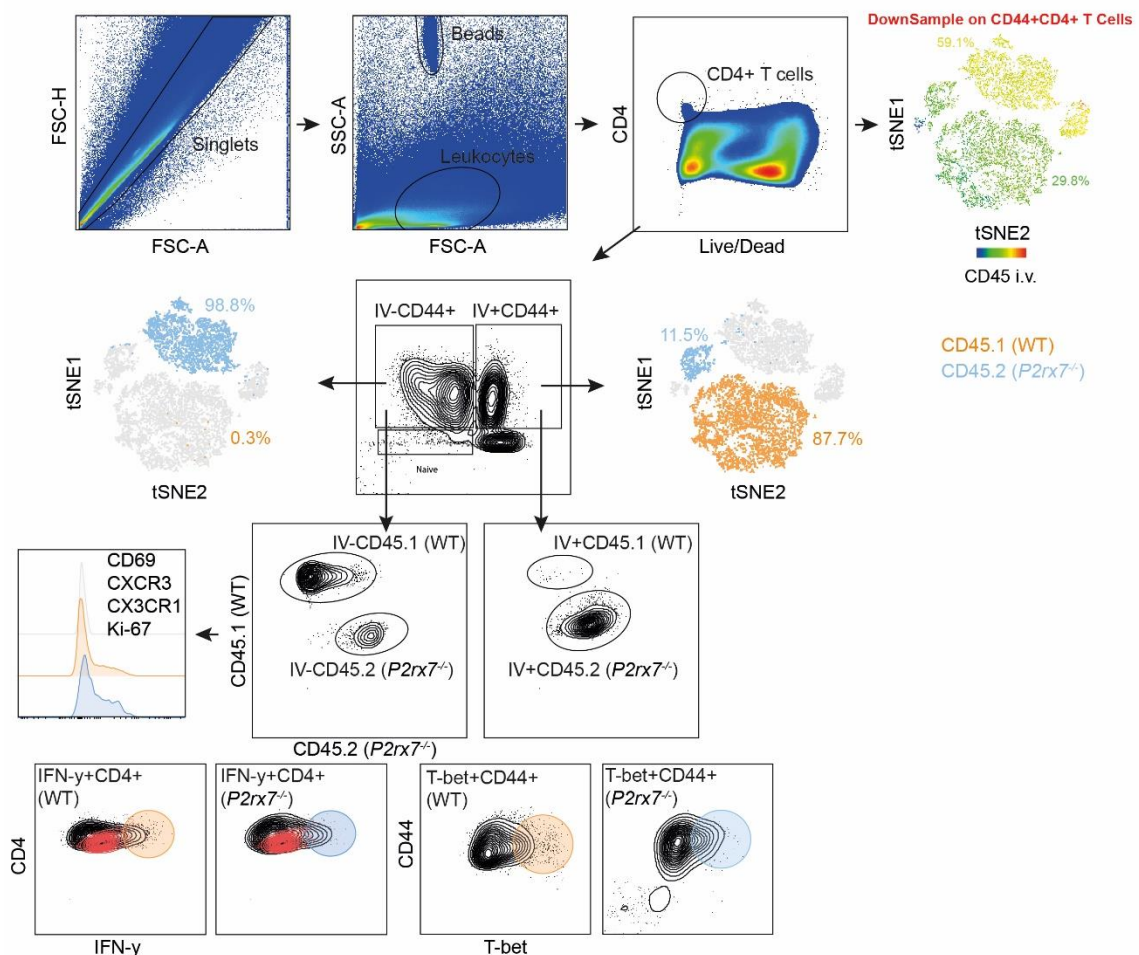
YEGUTKIN, Gennady G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research*, v. 1783, n. 5, p.673-694, May 2008.

APÊNDICE A - Estratégia de *gates* utilizadas para a análise de células T CD4⁺ parenquimatosas e intravasculares.

A Gate strategy for parenchymal and intravascular CD4⁺ T cell phenotyping

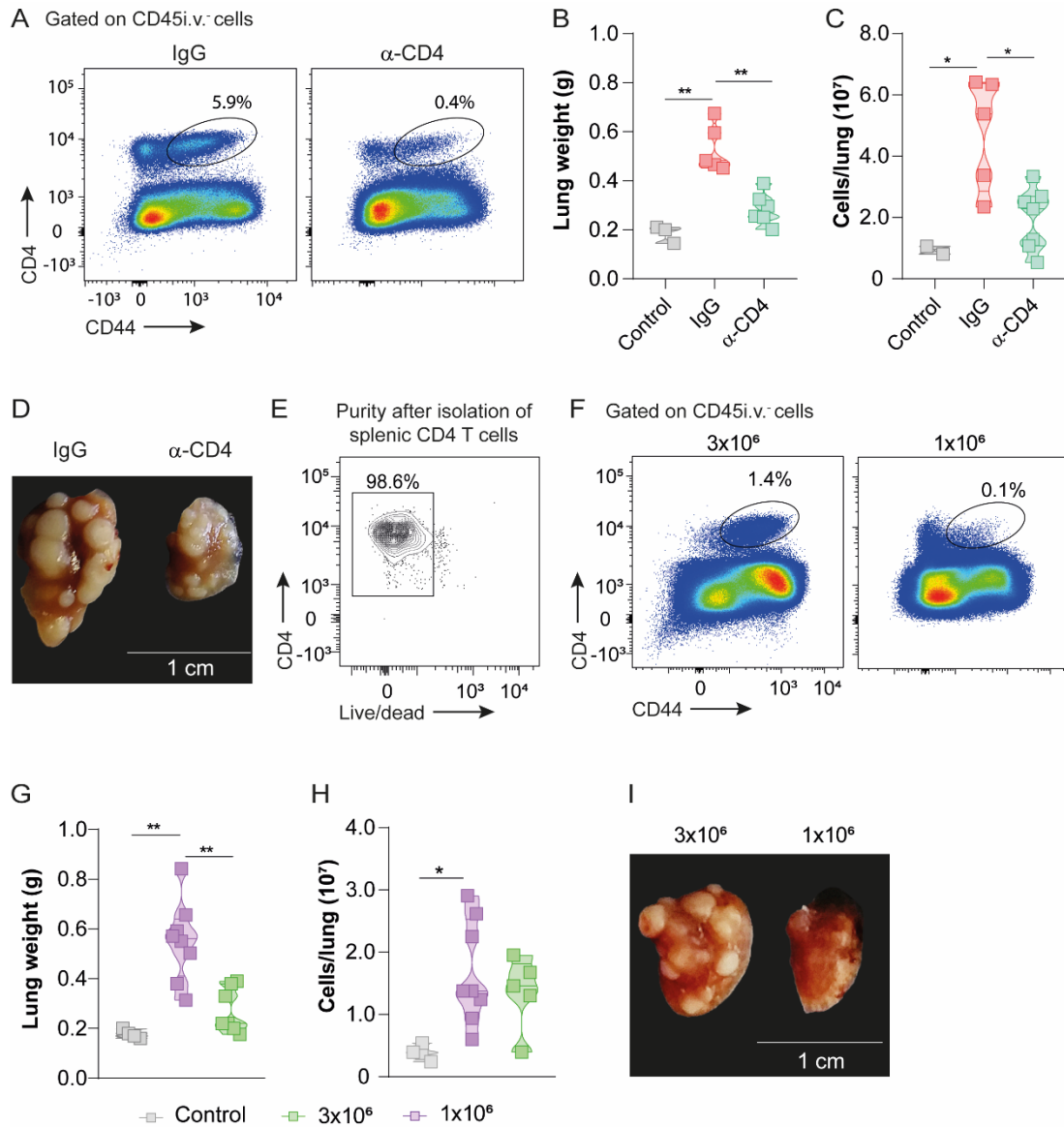


B Gate strategy for the study of CD4⁺ T cells residing in the same microenvironment (Lung and mLN)



Estratégias de gates utilizadas para a análise de células T CD4⁺ parenquimatosas e intravasculares. (A) Estratégia de gate para fenotipagem de células T CD4⁺ intravasculares e parenquimatosas. (B) Estratégia de gate utilizada para estudo de células T CD4⁺ residentes nos experimentos de cotransferência adotiva e com camundongos quimeras mistas de medula óssea.

APÊNDICE B – Efeitos das células T CD4⁺ residentes no pulmão na inflamação e dano pulmonar na tuberculose causada pela cepa *Mbv* MP287.



Efeitos das células T CD4⁺ residentes no pulmão na inflamação e dano pulmonar na tuberculose causada pela cepa *Mbv* MP287. Camundongos C57BL/6 foram infectados com ~100 bacilos da cepa hipervirulenta *Mbv* MP287. Camundongos não infectados foram usados como controles. No dia 28 p.i., os camundongos receberam injeção i.v. de anticorpo fluorescente anti-CD45 3 minutos antes da eutanásia. (A e F) Expressão de CD4 e CD44 em células pulmonares CD45 i.v.:. (B, C, G e H) Peso do pulmão e número total de células por pulmão. (D e I) Imagens macroscópicas do lobo superior direito do pulmão (1 cm). (E) Expressão de CD4 corado ou não por *Live/dead*. Os dados gráficos são mostrados como média \pm SEM. Os valores de p dos testes One-way ANOVA e post hoc de Tukey são indicados por *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

APÊNDICE C - P2X7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2021.



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
caiocecarbonfim@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 log₂ fold-change = 1.58, adjusted *P* value = 1.81e-04) (**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

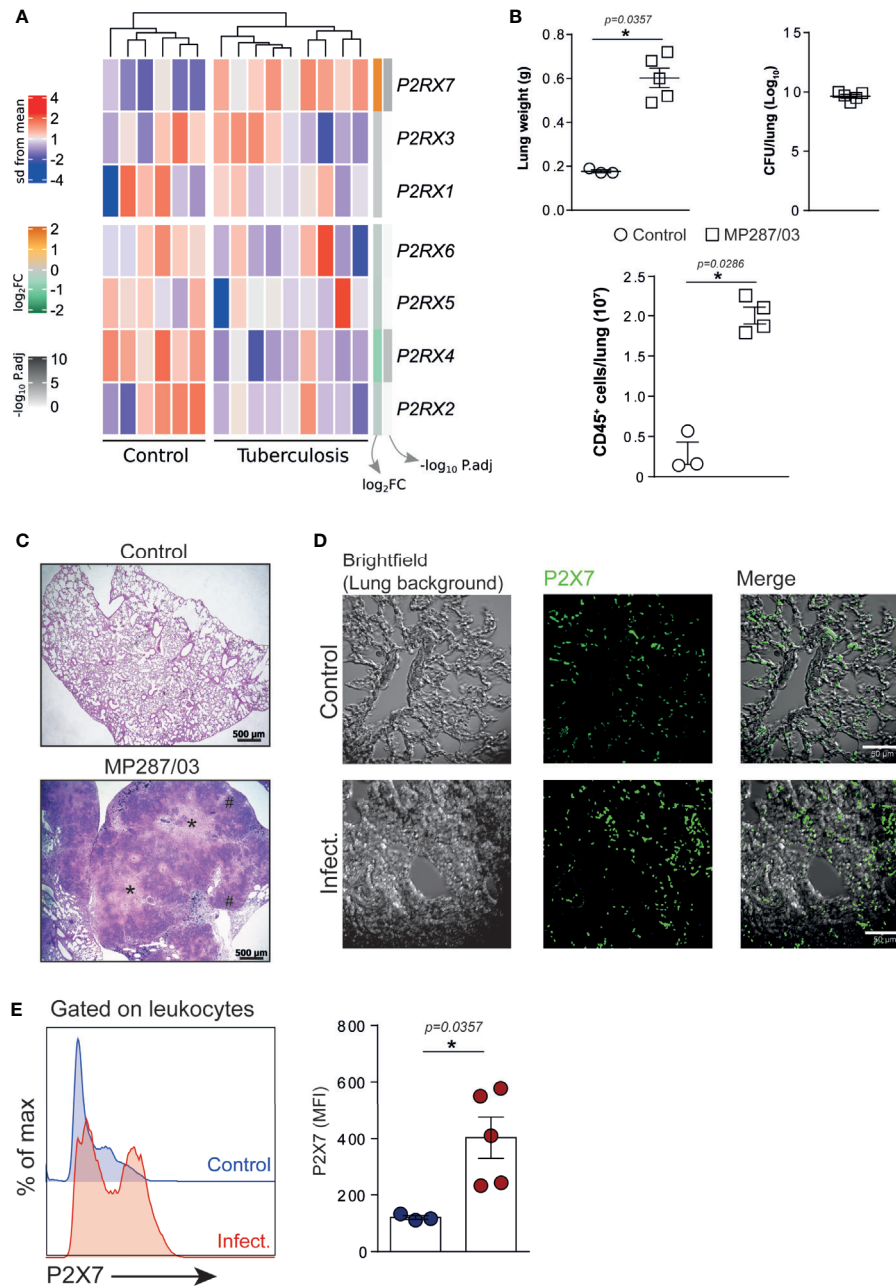


FIGURE 1 | The expression of *P2RX7* gene and P2X7 receptor is increased in the peripheral blood of TB patients and on lung leukocytes of mice with severe TB. **(A)** Gene expression counts were z-score normalized across all samples. \log_2 fold-change and $-\log_{10}$ P. adjust from DEG analysis are 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

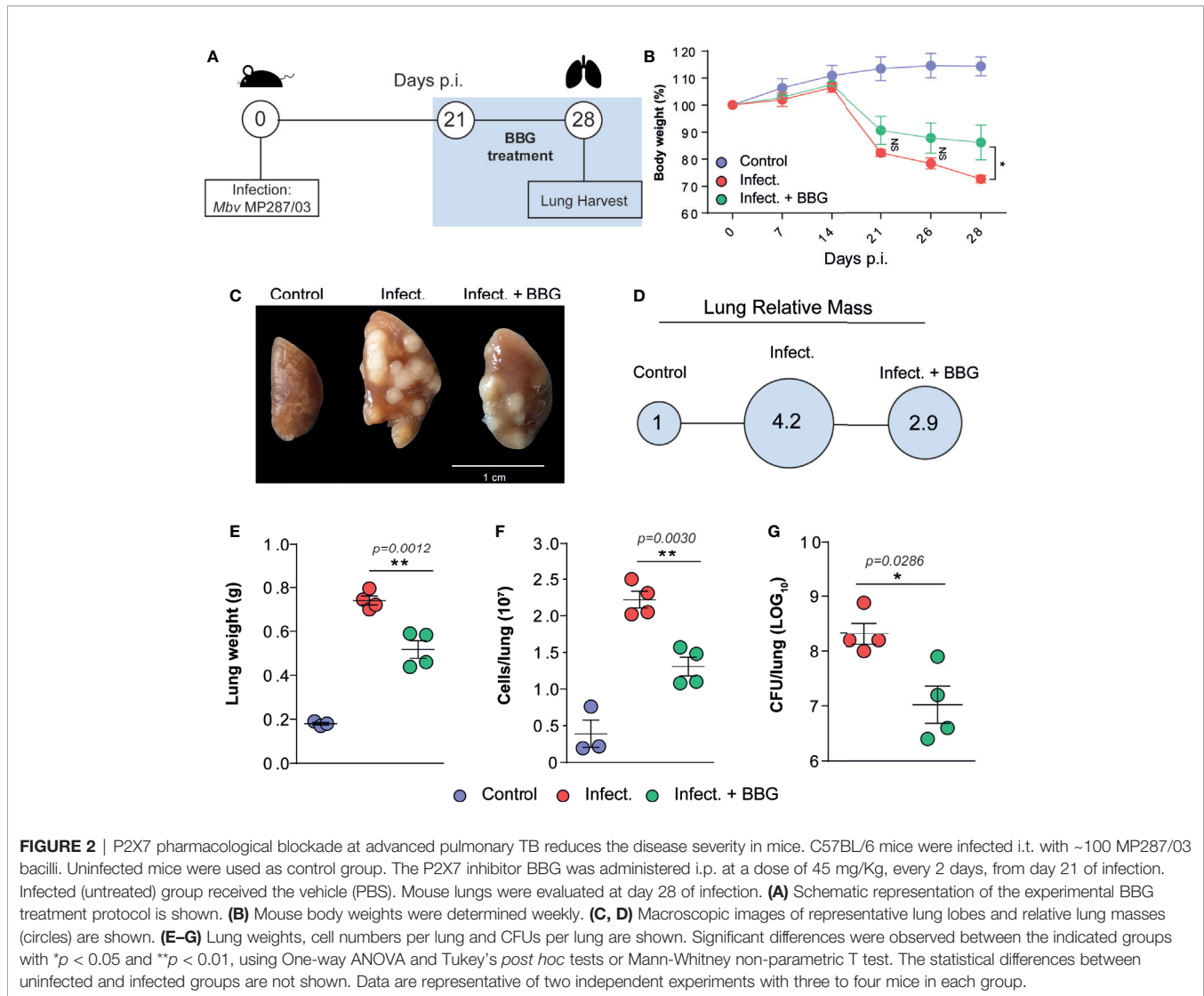


FIGURE 2 | P2X7 pharmacological blockade at advanced pulmonary TB reduces the disease severity in mice. C57BL/6 mice were infected i.t. with ~100 MP287/03 bacilli. Uninfected mice were used as control group. The P2X7 inhibitor BBG was administered i.p. at a dose of 45 mg/Kg, every 2 days, from day 21 of infection. Infected (untreated) group received the vehicle (PBS). Mouse lungs were evaluated at day 28 of infection. **(A)** Schematic representation of the experimental BBG treatment protocol is shown. **(B)** Mouse body weights were determined weekly. **(C, D)** Macroscopic images of representative lung lobes and relative lung masses (circles) are shown. **(E–G)** Lung weights, cell numbers per lung and CFUs per lung are shown. Significant differences were observed between the indicated groups with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, using One-way ANOVA and Tukey's *post hoc* tests or Mann-Whitney non-parametric T test. 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.

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

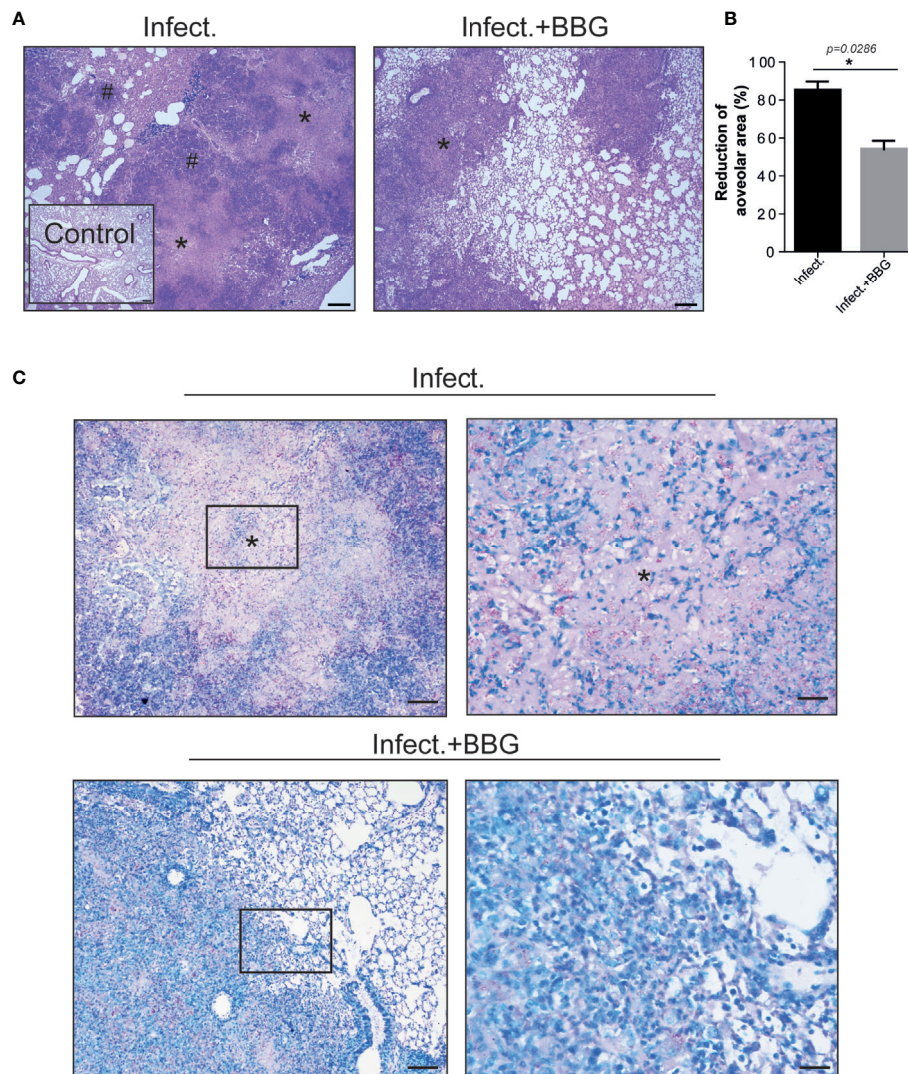


FIGURE 3 | P2X7 pharmacological blockade reduces tuberculous pulmonary lesions in mice. Histopathological changes in lungs of the BBG-treated and untreated mice, previously infected with ~100 MP287/03 bacilli, were evaluated at day 28 of infection. **(A)** Images of representative lung sections stained 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).

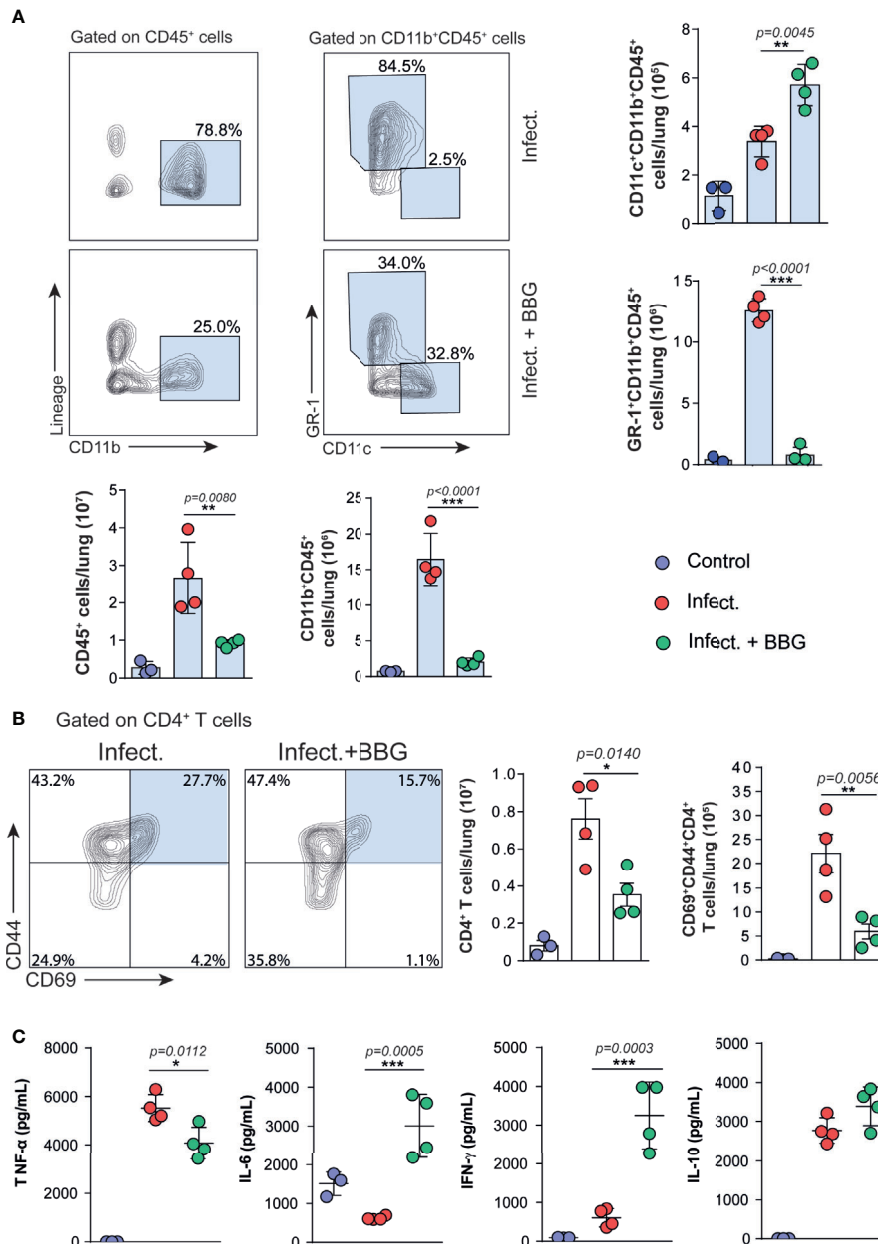
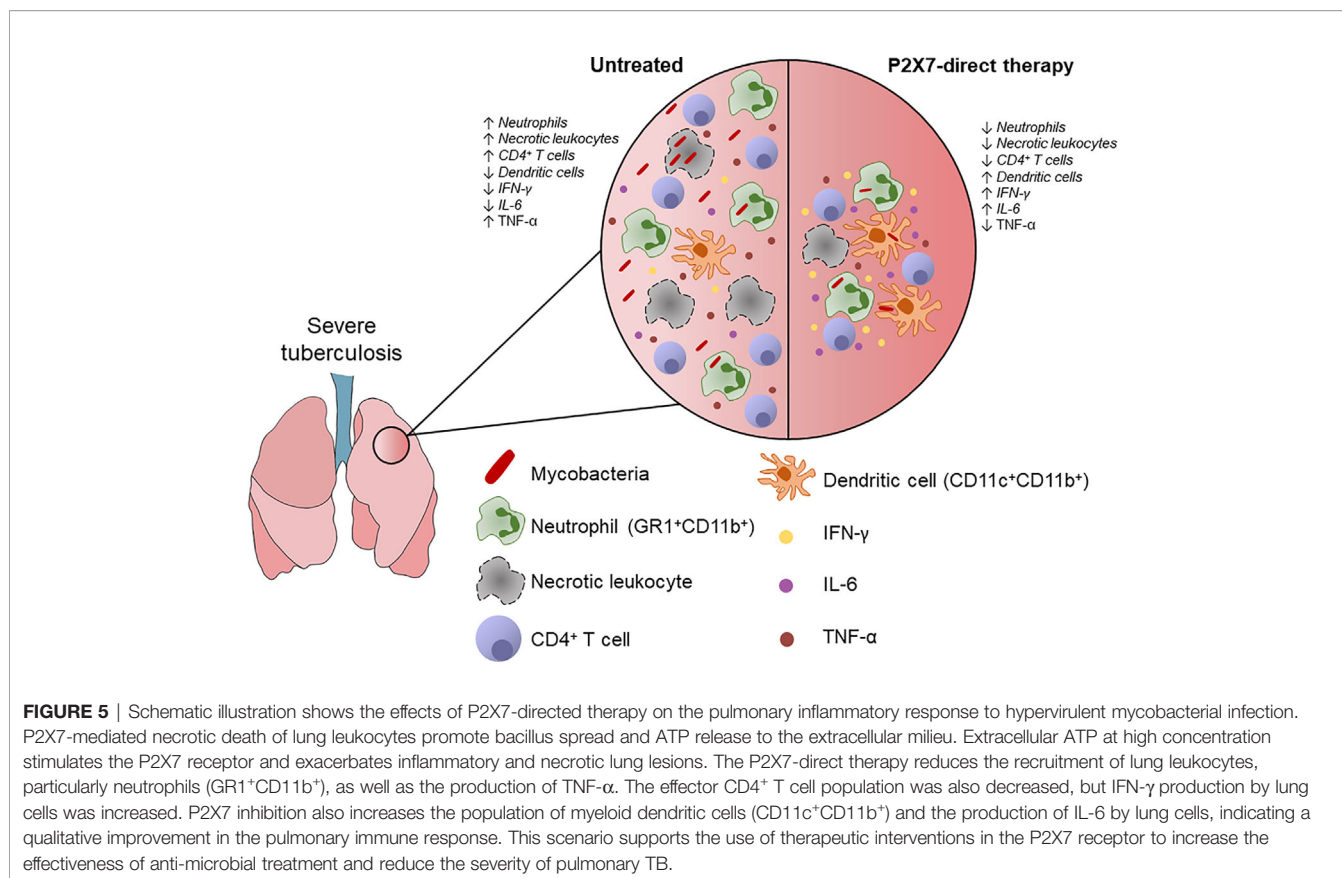


FIGURE 4 | P2X7-directed therapy reduces the pulmonary inflammatory response, but increases the population of CD11c⁺ myeloid cells and the production of IFN- γ and IL-6 by lung cells. Lung cells from BBG-treated and untreated mice were evaluated at day 28 p.i. with ~100 MP287/03 bacilli. Lung cells from 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), 3013–3020. doi: 10.1093/immunol/kjz1365
- 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.

APÊNDICE D - Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria. **The Journal of Infectious Diseases**, 2021.

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 canetti*, 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

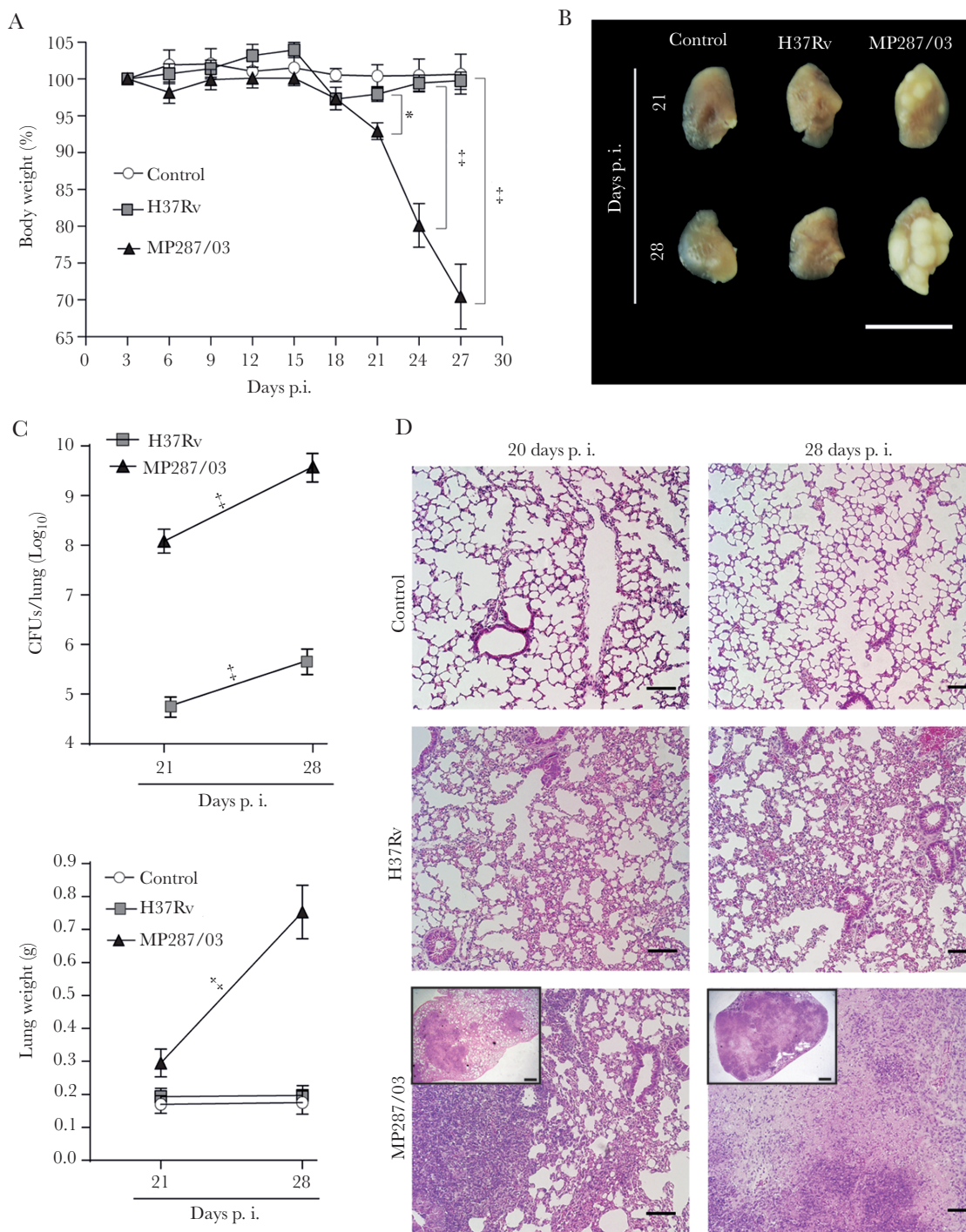
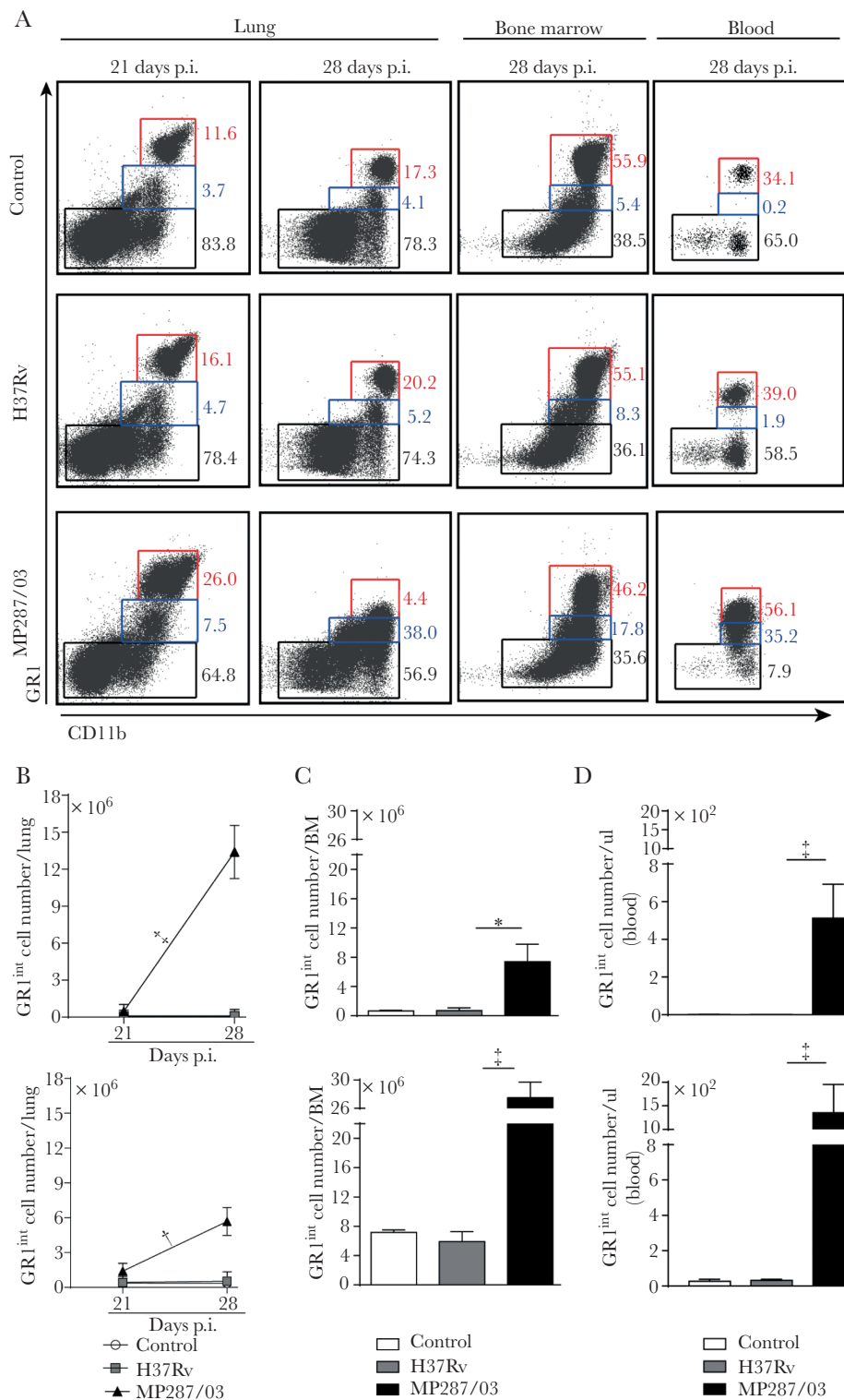


Figure 1. Pulmonary tuberculosis progresses rapidly in C57BL/6 mice infected with MP287/03 mycobacteria. C57BL/6 mice were infected intratracheally with approximately 100 H37Rv or MP287/03 bacilli, and noninfected mice were used as control. *A*, Percentages of body weights in relation to time 0 are shown. *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).



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

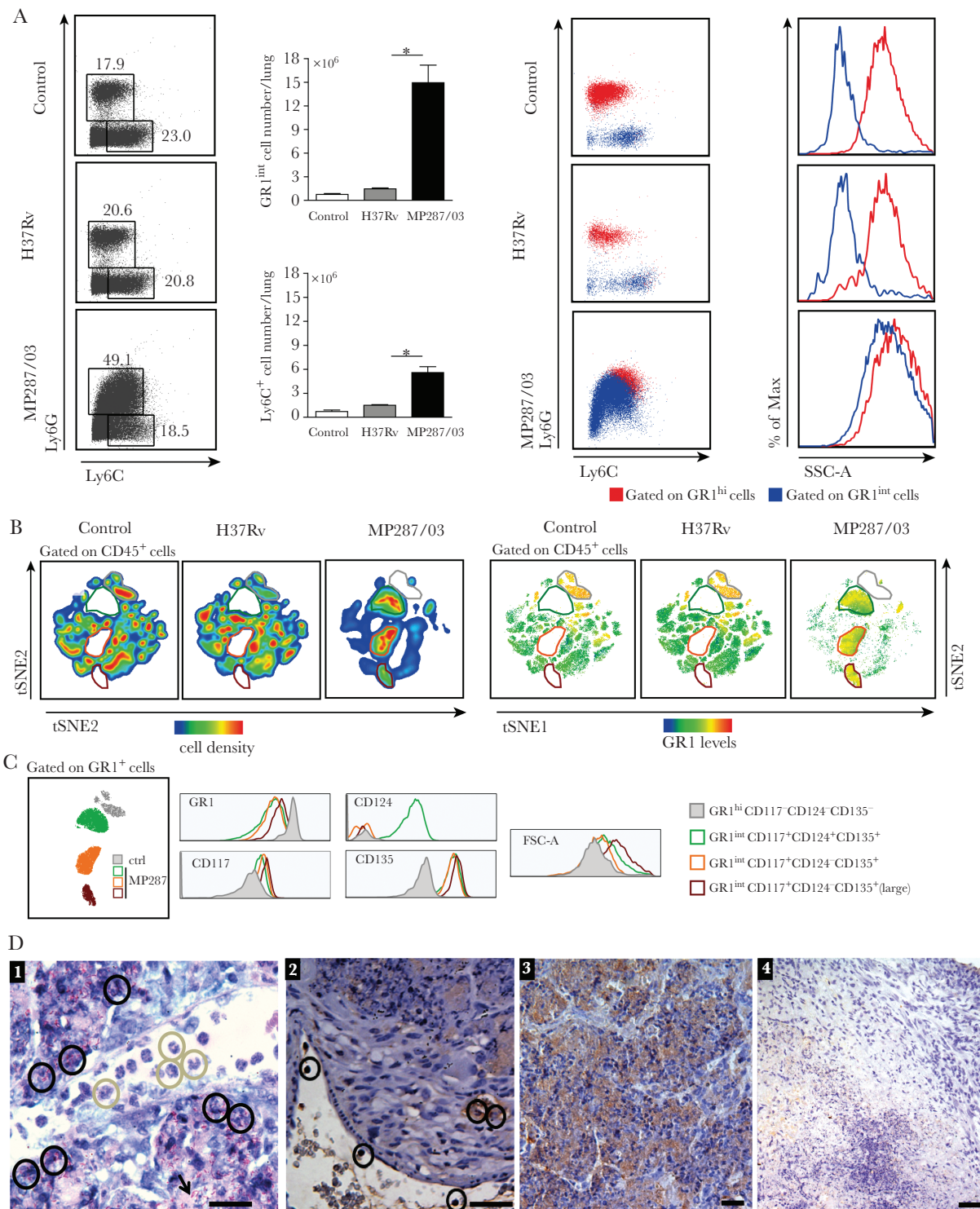


Figure 3. Immature granulocytic cells massively infiltrate the lungs during severe tuberculosis. *A–C*, Lung infiltrating cells were evaluated in C57BL/6 mice at day 28 after infection with approximately 100 H37Rv or MP287/03 bacilli. Noninfected mice were used as controls. *A*, *Left*, Dot plots showing 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 transminating 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.

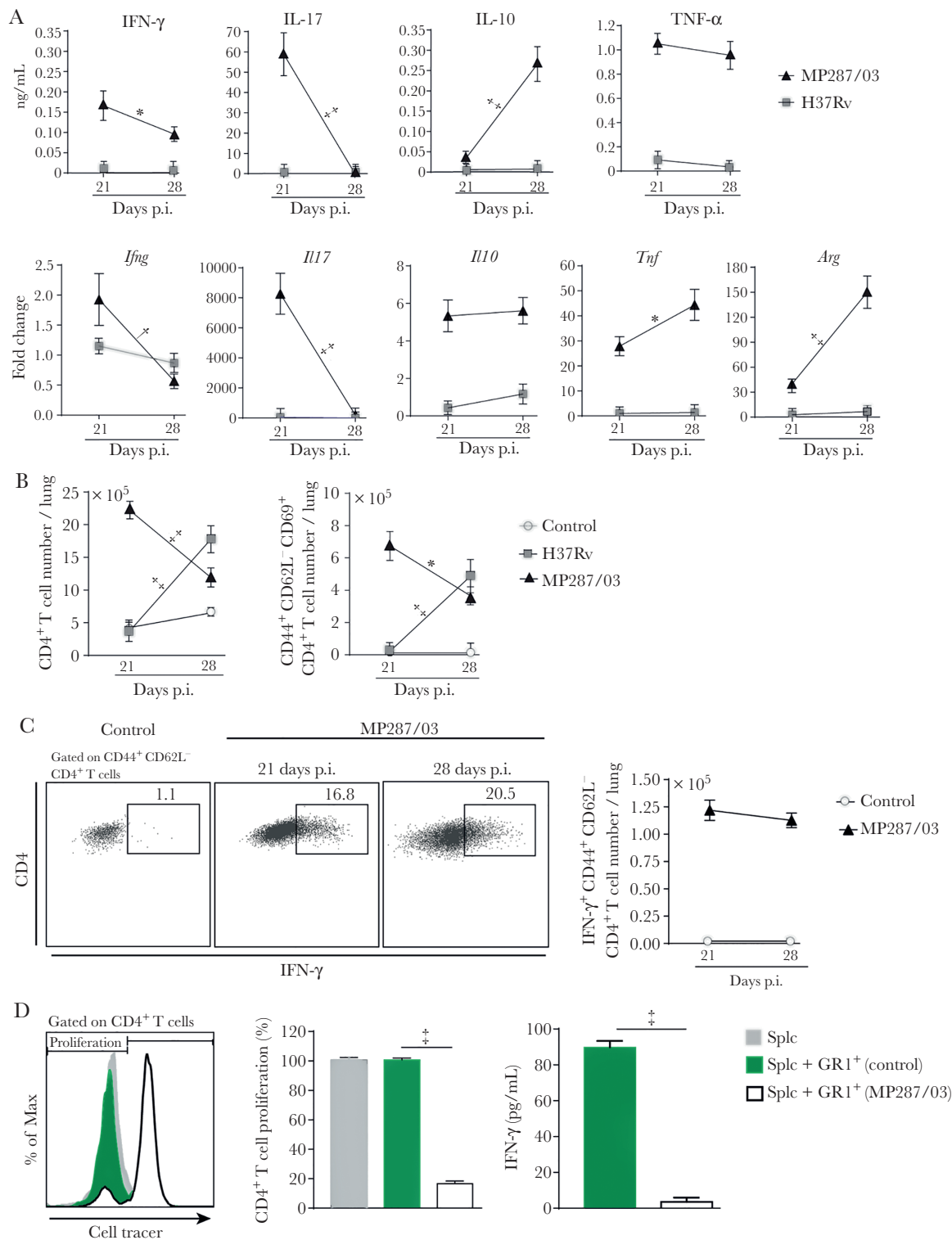


Figure 4. GR1⁺ cells suppress CD4⁺ T-cell responses. C57BL/6 mice were infected with approximately 100 H37Rv or MP287/03 bacilli, and noninfected mice were used as controls. **A**, Cytokine concentrations in 48-hour-culture supernatants of lung cells and the *Ifng*, *Il17a*, *Il10*, *Tnf*, and *Arg* 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

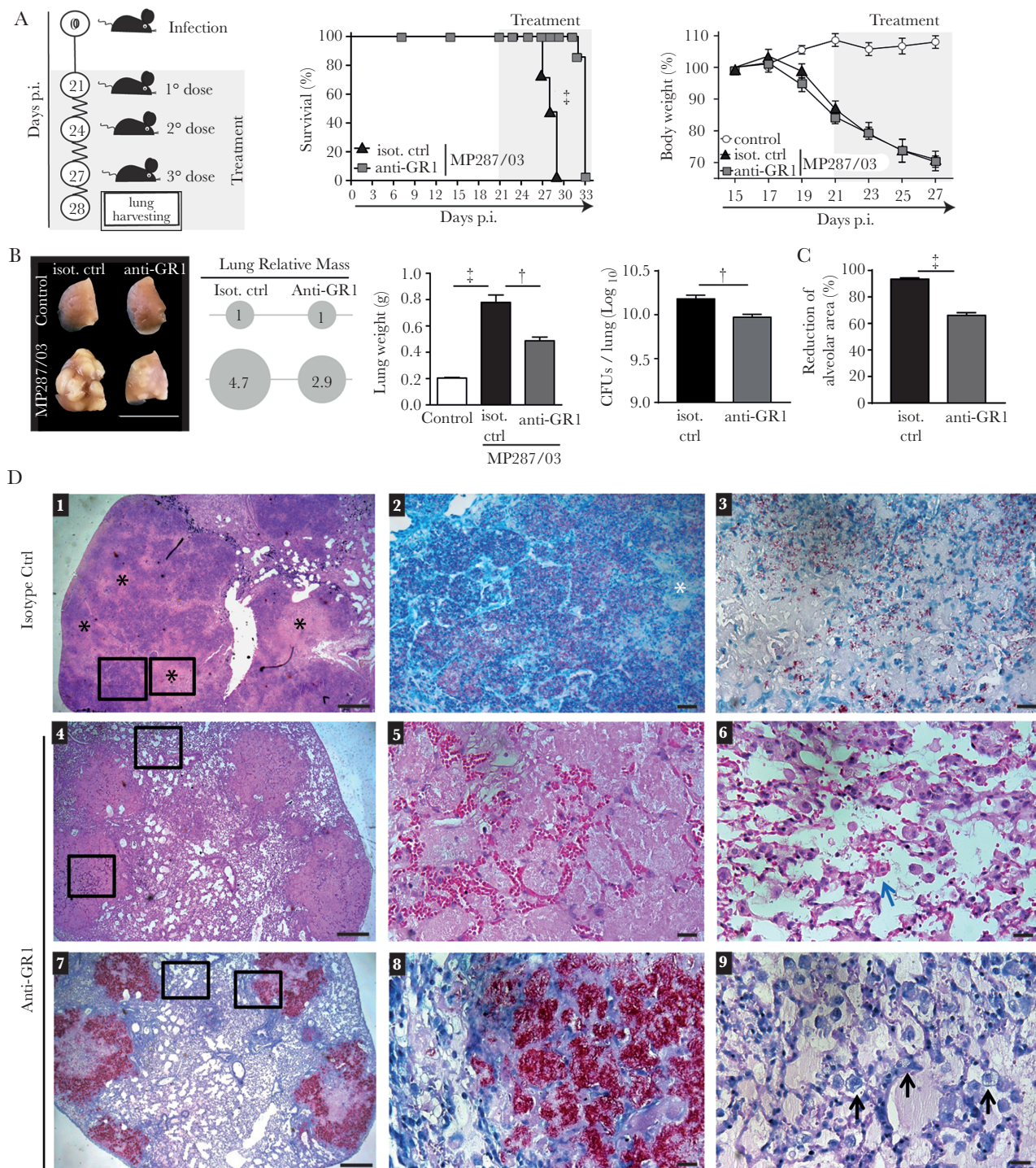


Figure 5. Anti-GR1 treatment reduces tuberculosis severity in MP287/03-infected mice. C57BL/6 mice were infected intratracheally with approximately 100 MP287/03 bacilli and treated with anti-GR1 monoclonal antibodies or isotype control. **A**, Schematic illustration of the experimental protocol for anti-GR1 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. $^{\dagger}P < .01$; $^{\ddagger}P < .001$.

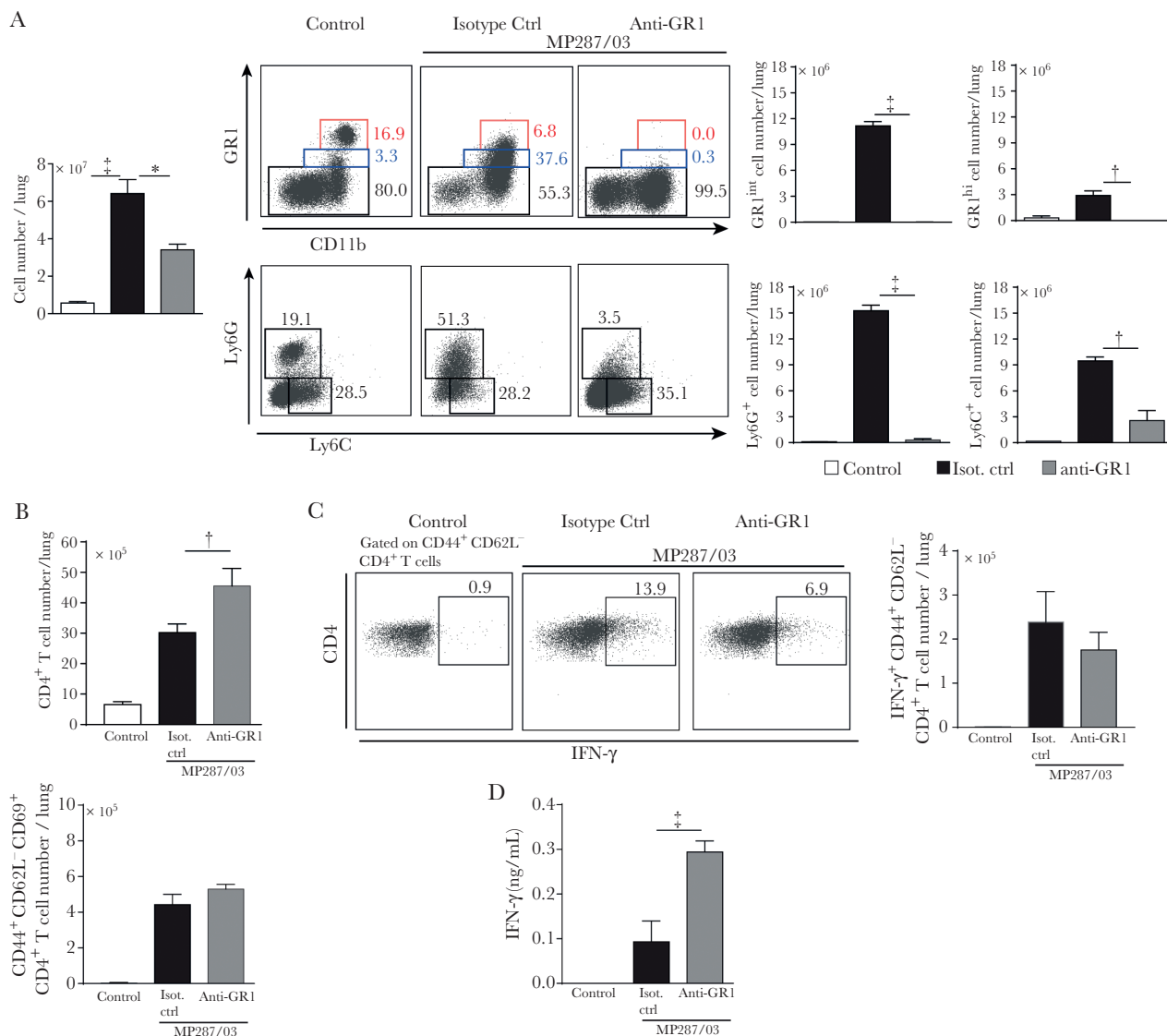


Figure 6. Anti-GR1 treatment efficiently depletes GR1⁺ cells and attenuates CD4⁺ T-cell suppression during severe tuberculosis. C57BL/6 mice were infected intratracheally with approximately 100 MP287/03 bacilli and treated with anti-GR1 monoclonal antibodies or isotype control. *A, Left*, Cell counts 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

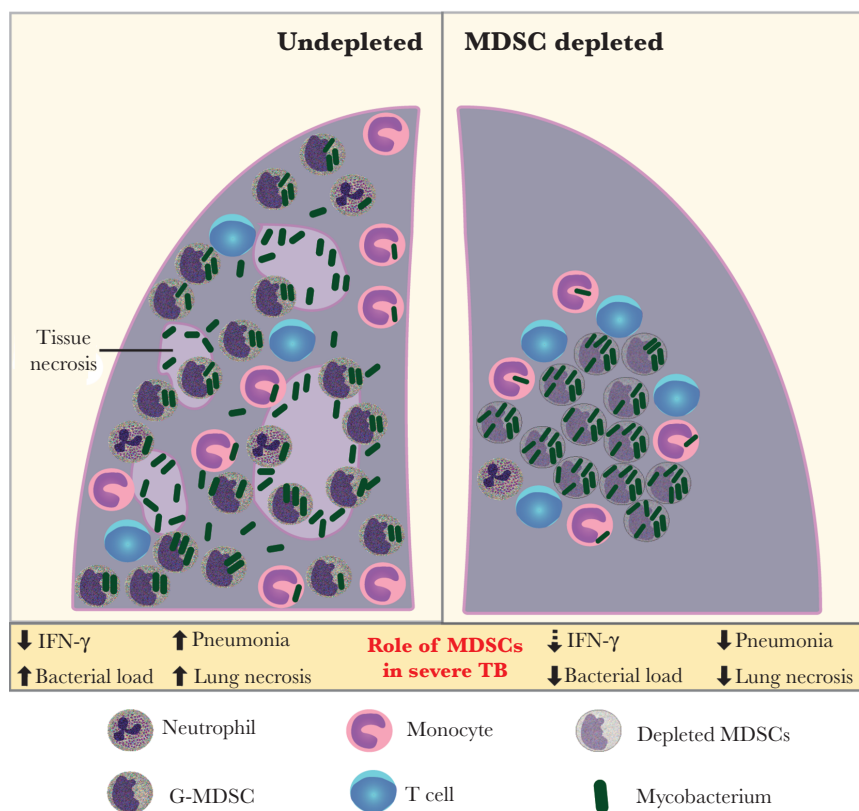


Figure 7. Schematic illustration showing the role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in severe tuberculosis caused by hypervirulent mycobacteria. In the advanced stage of tuberculosis caused by highly virulent mycobacteria, G-MDSCs produced in the bone marrow are massively recruited 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.

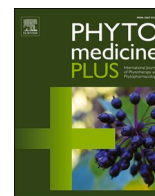
References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2019.
2. Khan MK, Islam MN, Ferdous J, Alam MM. An overview on epidemiology of tuberculosis. *Mymensingh Med J* 2019; 28:259–66.
3. 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.
4. Pagan AJ, Ramakrishnan L. Immunity and immunopathology in the tuberculous granuloma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 5:e1006687.
5. 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.
6. Bell LCK, Noursadeghi M. Pathogenesis of HIV-1 and *Mycobacterium tuberculosis* co-infection. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16:80–90.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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).

APÊNDICE E - Antitubercular and immunomodulatory activities of *Eugenia astringens* n-hexane fraction. **Phytomedicine Plus**, 2022.



Antitubercular and immunomodulatory activities of *Eugenia astringens* *n*-hexane fraction

Igor Santiago-Carvalho^{a,c,1,*}, Thatiana Lopes Biá Ventura Simão^{a,b,1,**},
 Sanderson Dias Calixto^{a,b}, Thalissa Cozentino de Albuquerque^b,
 Tatiana Ungaretti Paleo Konno^d, Rafael Moysés Salgado^c, Michelle Frazão Muzitano^b,
 Shaft Corrêa Pinto^b, Elena Lasunskia^{a,***}

^a Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

^b Laboratório de Produtos Bioativos, Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Campus Macaé, Pólo Novo Cavaleiro, 27933-378, Macaé, RJ, Brazil

^c Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo - USP, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

^d Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, NUPEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, 27965-045, Macaé, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Eugenia astringens Cambess
 Tuberculosis
 Antitubercular activity
 Immunomodulation
 Adjuvant treatment

ABSTRACT

Background: In Brazil, the *Eugenia* genus is traditionally used to treat several types of human diseases, including diabetes, gastric ulcers and rheumatoid arthritis. Previous studies demonstrated that medicinal properties of *Eugenia astringens* Cambess (Myrtaceae), popularly known as “bagaçu” in Brazil, were associated with anti-inflammatory and antimicrobial activities exhibited by the plant extracts. Anti-tubercular effects of *E. astringens* have not been elucidated yet.

Aim of the study: To study anti-tubercular and immunomodulatory potential of the *E. astringens* leaves extracts (syn. *E. umbelliflora* O. Berg), as well as the chemical profiles of active fractions.

Methods: The plant material was collected in the Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (Rio de Janeiro) and the leaves were dried and extracted with ethanol. The extracts were partitioned, to yield *n*-hexane (Hex), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (BuOH) fractions. The crude extract and fractions were evaluated for antitubercular effects in broth cultures of *M. tuberculosis* strains and assessed for cytotoxicity in mammalian cell cultures by the MTT method. The Hex fraction, exhibiting low cytotoxicity and stronger inhibitory effect on mycobacterial growth relative to other fractions, was selected for the further studies. Immunomodulatory effects of the Hex fraction were evaluated in the RAW 264.7 macrophages, stimulated by LPS to produce inflammatory mediators, such as TNF- α , IL-6 and nitric oxide. Additionally, the effects on mitogen-stimulated human lymphocyte functions were estimated by measuring cell proliferation and IFN- γ production.

Results: The *E. astringens* Hex fraction inhibited growth of mycobacterial strains both in the bacterial culture and infected macrophages, demonstrating strong anti-tubercular potential. In addition, this fraction suppressed secretion of inflammatory cytokines and reduced production of nitric oxide through inhibition of iNOS expression in the LPS-stimulated macrophages. In the mitogen-stimulated lymphocyte assay, Hex fraction inhibited cell proliferation but did not alter IFN- γ production. GC-MS analyses showed that the Hex fraction is composed by caryophyllene-type, eudesmane-type, cadinene-type, and aromadendrene-type sesquiterpenes; and 28 compounds were identified, including spathulenol, previously described for antitubercular activity. It is possible that the overall biological efficiency of the Hex fraction depends on the cumulative and/or synergistic effect of these sesquiterpenes.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

*** Corresponding author.

E-mail addresses: igorsantiagobr@gmail.com (I. Santiago-Carvalho), thativentura@yahoo.com.br (T.L.B.V. Simão), elassounskaia@gmail.com (E. Lasunskia).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100236>

Available online 9 February 2022

2667-0313/© 2022 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Conclusion: The Hex fraction of *E. astringens* leaves showed strong antitubercular and immunomodulatory activities, demonstrating pharmacological potential of the identified compounds for the development of new anti-TB drugs.

Abbreviations

ADC	albumin, dextrose, catalase	L-NMMA	L-N ^G -monomethyl Arginine acetate
BCG	Bacillus Calmette–Guérin	LPS	Lipopolysaccharide
BSA	Bovine Serum Albumin	LRI	Linear Retention Indices;
BuOH	<i>n</i> -butanol	Mbv	<i>Mycobacterium bovis</i>
CFU	Colony-forming unit	MIC	Minimum Inhibitory Concentration
DAB	3,3'-diaminobenzidine	MOI	Multiplicity of Infection
DCM	Dichloromethane	µg	Microgram
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12	Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DMF	Dimethylformamide	MTT	2H-Tetrazolium, 2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-, bromide
DMSO	Dimethyl sulfoxide	NO	Nitric Oxide
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	OADC	Oleic acid, albumin, dextrose, catalase
EtOAc	Ethyl acetate	O.D.	Optical density
FBS	Fetal Bovine Serum	PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
GC-FID	Gas chromatography-flame ionization detector	PBS	Phosphate-buffered saline
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry	PBST	Phosphate-buffered saline plus Tween
Hex	<i>n</i> -hexane	PHA	Phytohemagglutinin
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	RPMI	Cell Culture Medium Roswell Park Memorial Institute
IL-6	Interleukin-6	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
INF-γ	Interferon gamma	SEM	Standard Error of the Mean
iNOS	Nitric Oxide Synthase	TB	Tuberculosis
kDa	Kilodalton	TBST	Tris-buffered saline containing 0.05% Tween
		TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha.

1. Introduction

The Myrtaceae family (The [Angiosperm Phylogeny Group, 2009](#)) is composed of large trees and shrubs, which are inserted in approximately 150 genera and 3600 species ([Cronquist, 1981](#)). One of them is the genus *Eugenia*, including approximately 600 species, of which 400 are growing in Brazil ([Cronquist, 1981](#)). The *Eugenia* species are widely used in popular medicine because of their pharmacological and economic potential ([Queiroz et al., 2015](#)). Some species of the genus *Eugenia* are commonly associated with ethnobotanical use. For example, the leaves and fruits of the species *E. brasiliensis* and *E. beaurepaireana* were used by native population for the treatment of diarrhea, ulcerative and inflammatory diseases ([Revilla J, 2002](#)).

The species *E. astringens* Cambess (syn. *E. umbelliflora* O. Berg), popularly known as "araponga", "bagaçu", "guapé" or "guaramirim", can be found as a shrub or a small tree that measures 3 to 10 m. The species is widely found throughout the Brazilian regions, especially in the Atlantic Forest biome ([Legrand and Klein, 1969](#)). Its leaves and fruits have been used to treat diarrhea by local people around the "Restinga de Jurubatiba National Park", Rio de Janeiro, Brazil ([Santos et al., 2009](#)). Previous studies demonstrated that the extracts, fractions and essential oils isolated from the fruits of *E. astringens* exhibited antioxidant, hypoglycemic, hypocholesterolemic, anti-dermatophytic and anti-ulcer potential ([Machado et al., 2009](#); [Magina et al., 2010](#); [Meyre-Silva et al., 2009](#)). Additionally, preparations obtained from *E. astringens* and other species of *Eugenia* genus were studied for activity against gram-positive and gram-negative bacteria and some species of yeast-like fungi (reviewed by [da Costa et al., 2020](#); [De Souza et al., 2018](#)). Significant diversity of antimicrobial effects, associated with variability in the chemical composition, was described for different species that may

be attributed to intrinsic interspecies differences, different plant organs or extraction techniques used for preparation of plant samples. The *E. astringens* preparations (extracts, fractions or essential oils) exhibited antibacterial activity predominantly against gram-positive bacteria, including strains of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* ([Faqueti et al., 2015](#); [Machado et al., 2005](#)), with no or weak inhibitory effect on the growth of gram-negative bacteria and yeasts ([Faqueti et al., 2015](#); [Farias et al., 2020](#); [Machado et al., 2009](#); [Magina et al., 2009](#)).

However, the chemical and biological properties of *Eugenia* species were poorly investigated regarding its antitubercular potential. Inhibitory effect on growth of tuberculous mycobacteria was demonstrated only for the extracts from *E. mansoni* and *E. repanda* ([Bertucci et al., 2009](#)), but not for those from *E. uniflora* ([Bertucci et al., 2009](#)) or *E. pyriformis* ([Chavasco et al., 2014](#)). There is still no report on activity of *E. astringens* against mycobacterial strains causing tuberculosis (TB), as well as on the inflammatory process generated by these strains.

TB continues as a most deadly infectious disease in adults, causing 1.4 million deaths annually ([WHO, 2020](#)). A growing incidence of drug-resistant TB contributes to high mortality rate. Hypervirulent and drug-resistant strains can cause an exacerbated inflammatory process in the lungs, leading to necrotic pathology, formation of cavities, loss of respiratory function and death ([Hunter et al., 2011](#); [Orme and Basaraba, 2014](#)).

In recent years, host-directed adjuvant therapy directed on inhibition of exacerbated inflammation was suggested for the treatment of severe cases ([Palucci et al., 2018](#); [Young et al., 2020](#)). In this context, new pharmacological agents, exhibiting dual, antitubercular and anti-inflammatory activities, can provide therapeutic advantage in the severe TB cases. Natural products are important candidates in this search since about 70% of medicines used to treat infections are of natural origin ([Dashti et al., 2014](#)).

Given the wide range of biological properties attributed to

E. astringens, in this study, we evaluated the antitubercular, immunomodulatory and anti-inflammatory activities of ethanolic extract and fractions obtained from the leaves of this plant. Our data demonstrated that the hexane fraction derived from the crude extract of the leaves exhibited the highest inhibitory ability to restrict the growth of Mtb strains, suppress production of inflammatory mediators by stimulated macrophages and inhibit lymphocyte proliferation, without interfering with the production of IFN- γ .

2. Materials and methods

2.1. Plant material, extraction, and fractionation

The *Eugenia astringens* Cambess collection was authorized under SISBIO/ICMBio number: 62.455–11, and the work was authorized by SISGEN/MMA number: AAA989F. Leaves from *E. astringens* were obtained at Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (RJ/Brazil) in Quissamã (22°19.828'S; 41°46.338'O) on July 17, 2013. The botanical identification was carried out by Dr. Tatiana U. P. Konno, and a voucher specimen was deposited under the number RFA40506 in NUPEM, UFRJ Macaé.

The dried powder of leaves from *E. astringens* was extracted by static maceration with ethanol 92.8% w/w (Casa Wolff, Rio de Janeiro, Brazil), with the extraction solvent being renewed until the plant material was completely depleted. The ethanol extract was filtered and dried to give the crude extract.

The crude extract was resuspended in a water/methanol solution (9:1, v/v), then partitioned liquid/liquid with organic solvents in increasing order of polarity: *n*-hexane (Hex), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), and *n*-butanol (BuOH) (TEDIA, Fairfield, USA). The samples of dried fractions (10 mg) were solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO – Sigma-Aldrich), according to polarity, at a stock concentration of 20 mg/ml and sterilized by filtration using Millipore nylon membrane (0.22 μ m).

2.2. Gas chromatography analyses

Gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) analyses were performed on Shimadzu QP2010S equipment using a Restek RTX-5MS (5% phenyl/95% polydimethylsiloxane, Restek Corporation, Pennsylvania, USA) fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m), using helium as carrier gas (1.5 ml.min⁻¹). The injector temperature was 220 °C and the column oven programmed was 60–290 °C at 3 °C min⁻¹. Transfer line temperature was 240 °C, ion source was at 230 °C, EIMS, 70 eV, Scan Range 35–500, 1 scan/sec., solvent cut time 3.0 min.

Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) analyses were performed on Shimadzu GC-2010 Plus equipment using a Zebtron™ ZB-5MS (5% phenyl/95% polydimethylsiloxane, Phenomenex Inc., CA, USA) fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m), using hydrogen as carrier gas (1.0 ml.min⁻¹, linear velocity). The injector temperature was 250 °C and the column oven programmed was 60–246 °C at 3 °C min⁻¹ and hold time for 5 min at 246 °C. The FID temperature was 290 °C, the sample rate of signal acquire was 40 msec and delay time 3.0 min. The sample solutions (1.0 mg/ml) were dissolved in hexane, and 1.0 μ l was injected with split 1:25, and was analyzed in triplicate to obtain the% area of the constituents. A standard solution of *n*-alkanes C7–C30 (Supelco®) was used to obtain the experimental gas chromatographic linear retention indices (LRI).

Constituents of the fraction were identified by comparing the LRI (GC-FID) and MS fragmentation pattern (GC–MS) for each compound with corresponding reference data (Adams, 2007).

2.3. Mycobacterial culture and evaluation of bacterial growth

Three mycobacterial strains differed in virulence were used in this

study: *M. bovis* BCG (avirulent strain), *M. tuberculosis* H37Rv (standard virulent strain), and *M. tuberculosis* Beijing M299 (clinical isolate exhibiting increased virulence and resistance to rifampicin). Mbv strain BCG (Onco-BCG vaccine, Moreau strain, Copenhagen SEED# July 1978) was obtained from the Butantan Institute (São Paulo). The standard laboratory strain Mtb H37Rv (ATCC27294) and Mtb strain M299, isolated from a TB patient in Mozambique and characterized for virulence (Almeida et al., 2017; Ribeiro et al., 2014) and rifampicin susceptibility (Ventura et al., 2015) in previous studies, were provided by Dr. Philip Suffys (Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brazil). Mycobacterial strains were grown in Middlebrook 7H9 medium Difco (Detroit, MI, USA), containing 0.05% Tween 80 and 10% albumin, dextrose, catalase- ADC Difco (Detroit, MI, USA), for 7 days at 37 °C under Biosecurity level 3 containment conditions. The suspensions densities were measured by optical densitometry at 600 nm (OD₆₀₀) and corresponding bacterial concentrations were determined for each strain by colony-forming units (CFU) test, plating ten-fold serial dilutions of bacterial suspensions on Middlebrook 7H10 agar plates supplemented with 0.5% glycerol and 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase enrichment- OADC Difco (Detroit, MI, USA). The colony numbers were quantified after 21 days incubation at 37 °C.

The bacterial suspensions were plated (1 × 10⁷ CFU/ml) and incubated in the presence of plant ethanolic extract or fractions (BuOH, EtOAc, DCM and Hex) at the concentration of 4, 20, 100 and 500 μ g/ml or left untreated. Anti-TB antibiotic rifampicin (0.001 to 0.03 μ g/ml for Mbv BCG, 0.001 to 1 μ g/ml for H37Rv and 0.008 to 10 μ g/ml for Mtb M299 strain) was used as a control of bacterial growth inhibition. As a positive control for mycobacterial growth, Mbv BCG or Mtb H37Rv in untreated culture were used. The plates were sealed and incubated at 37 °C for 7 days for Mbv BCG and 5 days for the Mtb strains. After this period, the bacterial cultures were incubated for 3 h with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (5 mg/ml) and then treated with extraction buffer for dissolution of formazan crystals prepared with 20% sodium dodecyl sulfate- SDS, 50% dimethylformamide- DMF Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) for an additional 18 h. The optical density was measured at 570 nm.

2.4. Evaluation of mycobacterial growth in culture of infected macrophages

Murine RAW 264.7 macrophage-like cell line ATCC (Manassas, VA, USA) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in 5% CO₂ incubator. For experiments, the cells were seeded in 96-well plates (5 × 10⁵ cells/well) and incubated for 24 h at 37 °C. The mycobacterial suspension (strains BCG or H37Rv) was adjusted to 0.1 and added to the macrophage culture at the MOI of 1:1 (bacillus/macrophage) for 3 h at 37 °C. Extracellular bacteria were eliminated by 5 washes with sterile PBS and the infected cell monolayers were treated for 4 days with *n*-hexane fraction (Hex) at the concentrations of 4, 20, and 100 μ g/ml or with rifampicin (0.001, 0.003 and 0.03 μ g/ml for BCG and 0.001, 0.01 and 1 μ g/ml to H37Rv). As a positive control for mycobacterial growth, untreated Mbv BCG and Mtb H37Rv strain was used. On day 4 after infection, the infected monolayers were lysed with 1% saponin to release intracellular bacteria and ten-fold serial dilutions in sterile PBS were plated on 7H10 agar plates for the CFU test.

2.5. Cytotoxicity assays

Cytotoxicity of the *E. astringens* ethanol extract and fractions towards mammalian cells was studied in the cultures of RAW 264.7 cells and epithelial Vero cells. The cells were cultured in DMEM-F12 supplemented with 10% FBS at 37 °C in 5% CO₂ incubator. For experiments, the cells were seeded in 96-well plates (5 × 10⁵ cells/well) and treated with the samples (4, 20, 100 and 500 μ g/ml) for 24 h at 37 °C. The resulted cell viability was examined by colorimetric MTT tetrazolium

reduction assay. For this, the medium of each well was removed and DMEM medium containing 5 mg/ml MTT solution was added to each well. After 2 h of incubation at 37 °C in the absence of light, the medium was removed and the formazan crystals were dissolved with acidified isopropanol (4 mM). Absorbance was read at 540 nm. Cells treated with 1% Triton X-100 detergent were used as a positive control (100% cytotoxicity), untreated cells were used as a negative control. The results were expressed as a percentage of the maximal absorbance value of the positive control and reported as means of three independent assays \pm the standard deviation. % cytotoxicity = $[(Asamp - Ab) \times 100] / (Ap - Ab)$, where Ab is an absorbance of negative control; Asamp is an absorbance of the test well, Ap - absorbance of positive control.

2.6. Production of inflammatory mediators by LPS-stimulated macrophages

RAW 264.7 macrophages were plated in 96-well plates (5×10^5 cell/well). After 24 h incubation at 37 °C, cells were stimulated with 1 μ g/ml LPS (*Escherichia coli* 055: B5 - Sigma-Aldrich) and treated with the Hex fraction of *E. astringens* (4, 20 and 100 μ g/ml) for additional 24 h. The culture supernatants were collected for the quantification of inflammatory mediators: nitric oxide (NO), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6).

Production of NO was assessed by the Griess method, through incubation of the cells with 1% p-aminobenzenesulfonamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid - Sigma-Aldrich) to measure nitrite, a stable NO metabolite. The NO inhibitor, L-NMMA (NG-methyl-L-arginine acetate - Sigma-Aldrich), was used as a positive control of NO inhibition at 20 μ g/ml.

For the quantification of TNF- α , the L929 fibroblast bioassay, based on the sensitivity of L929 cells to the cytotoxic effect of TNF- α , was performed. The L929 cells were plated (2.5×10^5 cell/well) and after 24 h incubation at 37 °C, the macrophage culture supernatants and actinomycin D (2 μ g/ml) were added. After incubation for additional 24 h, the cell viability was assessed by the MTT method. Quantification of IL-6 in the macrophage culture supernatants was performed by the ELISA, using commercial Mouse IL-6 kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the manufacturer's instructions.

Non-stimulated and untreated macrophages were used as a negative control (C-) and macrophages stimulated with LPS were used as a positive control (C+).

2.7. Evaluation of iNOS expression by western blot

RAW 264.7 macrophages were plated (1×10^6 cells/ml) in a 6-well plate and incubated for 24 h at 37 °C. After 24 h, the macrophage cultures were treated with Hex fraction (20 and 100 μ g/ml) and/or LPS (1 μ g/ml) for an additional 24 h. The cell monolayers were washed with PBS, scraped, and centrifuged to obtain a cell pellet. The cells were lysed in a buffer (10% SDS, 20% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 2% bromophenol blue, and 1 M Tris-HCl, pH 6.8, containing protease inhibitors - Sigma-Aldrich). Protein concentration was estimated by the Bradford method. Sixty micrograms of the protein were submitted to 10% SDS-polyacrylamide gel in the MiniVE Vertical Electrophoresis System (GE-Healthcare, Santa Cruz Biotechnology) for electrophoresis and then transferred to nitrocellulose membrane. The resulted membrane was then blocked in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween (TBST) and 2.5% bovine serum albumin (BSA) overnight at 4 °C. Subsequently, the membrane was incubated with a monoclonal antibody against iNOS, 1:1000 (BD Bioscience) for 1 h at room temperature. After the incubation period, the membrane was washed and incubated with rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, 1:5000 (GE-Healthcare, Santa Cruz Biotechnology) for 1 h at room temperature. Finally, the membrane was washed extensively, and the bands were developed using 3,3'-diaminobenzidine (DAB - Sigma-Aldrich) and H₂O₂ substrate. Non-stimulated and untreated macrophage culture was

Table 1
Chemical composition of Hex fraction from *E. astringens*.

Peak	LRI calc	LRI Lit	Compounds	Area %	SD
1	1374	1373	Ylangene < α ->	0,37	0,01
2	1382	NI	C ₁₅ H ₂₄	0,08	0,01
3	1388	1389	Elemene < β ->	0,06	0,02
4	1403	1400	Longipinene < β ->	0,08	0,01
5	1418	1417	Caryophyllene <(E)->	1,09	0,24
6	1429	1430	Copaene < β ->	1,00	0,01
7	1437	1439	Aromadendrene	3,83	0,02
8	1448	1448	Muurolo-3,5-diene <cis->	0,52	0,02
9	1458	1458	Aromadendrene <allo->	1,10	0,02
10	1468	1465	Muurolo-4(14),5-diene <cis->	1,05	0,00
11	1473	1475	Gurjunene < γ ->	0,39	0,01
12	1487	1489	Selinene <β->	6,05	0,09
13	1490	1492	Selinene < δ ->	0,59	0,08
14	1494	1498	Selinene <α->	2,77	0,48
15	1511	1511	Amorphene < δ ->	0,48	0,02
16	1514	1513	Cadinene < γ ->	0,24	0,01
17	1520	1521	Calamene <trans->	5,53	0,05
18	1553	1544	Calacorene < α ->	1,18	0,11
19	1560	NI	C ₁₅ H ₂₆ O	0,83	0,03
20	1575	1577	Spathulol	3,54	0,12
21	1580	NI	C ₁₅ H ₂₆ O*	1,84	0,10
22	1584	1582	Caryophyllene oxide*	6,83	0,21
23	1592	1592	Viridiflorol	1,01	0,05
24	1602	1600	Guaiol	0,94	0,01
25	1605	NI	C ₁₅ H ₂₄ O	0,16	0,01
26	1610	NI	C ₁₅ H ₂₆ O	0,20	0,02
27	1615	NI	C ₁₅ H ₂₆ O	0,39	0,00
28	1623	NI	C ₁₅ H ₂₆ O	0,17	0,02
29	1624	1627	Cubenol <1-epi->	2,56	0,03
30	1630	NI	C ₁₅ H ₂₆ O	1,03	0,03
31	1631	NI	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	1,14	0,04
32	1635	1639	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5β-ol	5,24	0,16
33	1641	1639	C ₁₅ H ₂₄ O	0,52	0,01
34	1649	NI	C ₁₅ H ₂₆ O	0,39	0,01
35	1654	1656	Bisabolol oxide B <α->	4,85	0,32
36	1656	1658	Selin-11-en-4-α-ol	4,78	0,10
37	1668	1668	Caryophyllene <14-hydroxy-9-epi-(E)->	3,78	0,02
38	1672	NI	C ₁₅ H ₂₆ O	0,27	0,01
39	1676	1676	Guaia-3,10(14)-dien-11-ol	0,24	0,01
40	1680	NI	C ₁₅ H ₂₄ O	0,71	0,03
41	1728	NI	C ₁₅ H ₂₂ O	0,62	0,02
42	1810	NI	C ₁₅ H ₂₄ O	1,22	0,94
43	1826	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	1,10	0,46
44	1828	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,79	0,47
45	1835	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	1,50	0,04
46	1840	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,48	0,02
47	1845	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,04	0,02
48	1860	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,61	0,03
49	1864	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,55	0,01
50	1873	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,15	0,01
51	1879	NI	C₁₅H₂₆O₂	8,30	0,22
52	1883	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,37	0,01
53	1894	NI	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	0,27	0,01
54	1899	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,22	0,01
55	1924	NI	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0,32	0,01
56	1927	NI	C ₂₀ H ₃₆ O	1,00	0,04
57	1934	NI	C ₂₀ H ₄₀ O	0,56	0,04
58	1958	NI	C₂₀H₄₀O	4,16	0,13
59	2158	NI	C ₂₀ H ₄₀ O	1,05	0,05
60	2386	NI	Bisoflex DOA (plasticizer)**	8,09	0,29
61	2600	NI	Phthalic acid derivative**	0,79	0,04
			Sesquiterpene hydrocarbons	26,39	
			Oxygenated sesquiterpenes	57,96	
			Diterpenes	6,77	
			Total identified	69,16	

NI: Not identified.

* overlap signal.

** contaminant identified by similarity data comparison (NIST08).

used as a negative control (C⁻) and the LPS treated-macrophages as a positive control (C⁺). The protein bands were scanned and the densitometric analysis was performed using Image J software of National Institutes of Health (NIH - Bethesda, MD, USA).

2.8. Lymphocyte proliferation assay and quantification of IFN- γ production

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the peripheral blood of healthy male individuals (with their consent and was approved by the institutional human experimentation committee) by gradient centrifugation with Ficoll-Paque. The cells were washed two to three times with RPMI-1640 medium (Gibco/Life Technologies), by centrifugation cycles at 4 °C for 10 min. After centrifugation, the cells were plated (1×10^6 cells/well) in RPMI-1640 supplemented with 20% FBS, 0.4% gentamycin, 0.1 mM L-glutamine and the phytohemagglutinin, PHA, 5 μ g/ml (Sigma-Aldrich) was added as a mitogen. The PBMC were incubated for 5 days at 37 °C and 5% CO₂ in the presence of Hex fraction of *E. astringens* (4, 20, and 100 μ g/ml) or without the fraction. The cells were left untreated with the PHA for the negative control. Cell viability during the test was more than 95% determined by the Trypan blue dye exclusion test. Cell proliferation capacity was assessed using the MTT method. Cyclosporine (Sigma-Aldrich), an immunosuppressive drug, was used for control of the cell proliferation inhibition. Unstimulated and untreated cells were used as a negative control (C⁻) and untreated PHA-stimulated cells were used as a positive control (C⁺) Production of IFN- γ by the mitogen-stimulated cells was measured in the culture supernatant, using Human IFN- γ ELISA kit (BD Biosciences), following the manufacturer's protocol.

2.9. Statistical analysis

The data were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test, was used to compare multiple groups, and *p* values <0.05 were considered significant. The IC₅₀ and MIC₅₀ values were calculated by non-linear regression. The used software was GraphPad Prism 4 and 6.

3. Results and discussion

3.1. Phytochemical investigation by gas chromatography-mass spectrometry

The phytochemical profile for the bioactive Hex fraction obtained by GC-MS (Suppl. Fig.1) revealed sesquiterpenes as the main constituents (84.35%). A total of 61 compounds were annotated (Table S1 – Supplementary Material) and 28 were identified (Table 1), corresponding to 69.16% of the chromatogram total area. Among the identified compounds from Hex fraction, caryophyllene-type (18.08%), eudesmane-type (14.18%), cadinene-type (11.55%), and aromadendrene-type (9.48%) sesquiterpenes are the most abundant skeletons (Table 1). The fraction has 13 major constituents between 2.5 and 8.3%, being them caryophyllene oxide (6.83%), β -selinene (6.05%), (*E*)-calamenene (5.53%), caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 β -ol (5.24%), α -bisabolol oxide B (4.85%), Selin-11-en-4- α -ol (4.78%), aromadendrene (3.83%), 14-hydroxy-9-*epi*-(*E*)-caryophyllene (3.78%), spathulenol (3.54%), α -selinene (2.77%), 1-*epi*-cubenol (2.56%), and two not identified compounds, a sesquiterpene C₁₅H₂₆O₂ (8.30%) and a diterpene C₂₀H₄₀O (4.16%) (Table 1).

In previous studies, similar sesquiterpene-types (Table 1) were found in a variety of preparations from *E. astringens* and other *Eugenia* species (De Souza et al., 2018) Thus, β -caryophyllene, α -copaene and (*Z*)-calamenene, was related to the essential oil from *E. astringens* leaves collected in Juréia, São Paulo State (Apel et al., 2002). The aromadendrene-type sesquiterpenes: aromadendrene, viridiflorol and spathulenol were found in the essential oil of *E. astringens* species

Table 2

Minimum inhibitory concentrations of *E. astringens* extract and its fractions suppressing the growth of *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* strain H37Rv in broth culture.

MIC ₅₀ (μ g/mL) Samples	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
Extract	98.3 \pm 1.3	> 500
BuOH fraction	90.7 \pm 1.7	> 500
EtOAc fraction	57.7 \pm 1.3	> 500
DCM fraction	28.7 \pm 1.4	44.9 \pm 1.5
Hex fraction	15.9 \pm 1.2	18.6 \pm 1.6
Rifampicin*	0.01 \pm 0.5	0.1 \pm 0.2

* Anti-TB drug.

collected in Santo Amaro da Imperatriz, Santa Catarina State (Magina et al., 2009). Caryophyllene oxide and β -selinene, major constituents of the Hex fraction in our study, were identified in the essential oil of *E. uniflora* L. chemotype obtained in the Amazon region (Figueiredo et al., 2019). These data demonstrate that the compounds of *E. astringens* from Jurubatiba Restinga identified in this study are similar to the sesquiterpene skeletons found in the *Eugenia* genera.

3.2. Effect of *E. astringens* extract and fractions on growth rates of *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* H37Rv strains in bacterial culture

The data presented in Table 2 demonstrate that the Hex and DCM fractions were notably the most potent inhibitors of mycobacterial growth. The ability of these fractions to suppress BCG growth (MIC₅₀ 15.9 \pm 1.2 μ g/ml and 28.7 \pm 1.4 μ g/ml, respectively) was at least 3-fold higher than that of the crude extract (MIC₅₀ 98.3 \pm 1.3 μ g/ml). Importantly, these fractions were able to inhibit the growth of virulent Mtb strain H37Rv as well, and again the Hex fraction was the most potent, exhibiting the lowest (MIC₅₀ 18.6 \pm 1.6 μ g/ml), whereas the crude extract exhibited only weak activity against the virulent strain (MIC₅₀ > 500 μ g/ml). Nevertheless, none of the samples tested was more active than the standard anti-TB drug rifampicin (Table 2).

The highest antitubercular activity observed for the Hex fraction can be attributed to the fact that the nonpolar compounds generally concentrated in this fraction could provide a direct effect on the outer membrane of mycobacterial cell wall, rich in lipids, or could better penetrate it to reach their molecular targets inside the cell (Chen et al., 2018).

Da Costa et al. (2020) have recently reviewed chemical compositions and antimicrobial activity of different Brazilian *Eugenia* species. The essential oil of *E. involucrate*, rich in sesquiterpenes β -elemene and spathulenol, displayed activity against Gram-positive (*S. mitis* and *S. sanguinis*) and Gram-negative bacteria (*P. nigrescens* and *P. gingivalis*), with MIC ranging from 100 to 400 μ g/mL. Activity against *P. aeruginosa* (MIC > 250 μ g/mL) and *E. coli* (MIC > 477 μ g/mL) have been described for oils of *E. astringens*, *E. beaurepaireana* and *E. brasiliensis* (Magina et al., 2009) mainly composed viridiflorol and β -pinene, spathulenol and β -caryophyllene. In addition, oils of *E. uniflora*, rich in cyclic oxygenated sesquiterpenes, showed activity against *S. mutans* and *S. sobrinus* (MIC 50 μ g/mL) and *K. rhizophila* (MIC 500 μ g/mL). Machado et al. (2005) reported that the methanolic extract of *E. astringens* leaves and respective fractions DCM and EtOAc exhibited activity only against Gram positive bacteria, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* and *S. agalactiae* (MIC 10–80 μ g/ml). Acetonic extract of *E. uniflora* leaves and their aqueous fraction (presence of high content of polyphenols) inhibited *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* but not *E. coli* (Falcão et al., 2018). In a different way, ethanolic leaves extract of *E. calycina* and their hexanic fraction displayed weak activity or were inactive against the Gram-positive and Gram-negative bacteria (Ferreira et al., 2014). In this study, the level of susceptibility of *M. bovis* BCG and Mtb to ethanolic extract of *E. astringens* leaves (MIC values between 100 and >500 μ g/ml) was comparable to that observed in the literature to

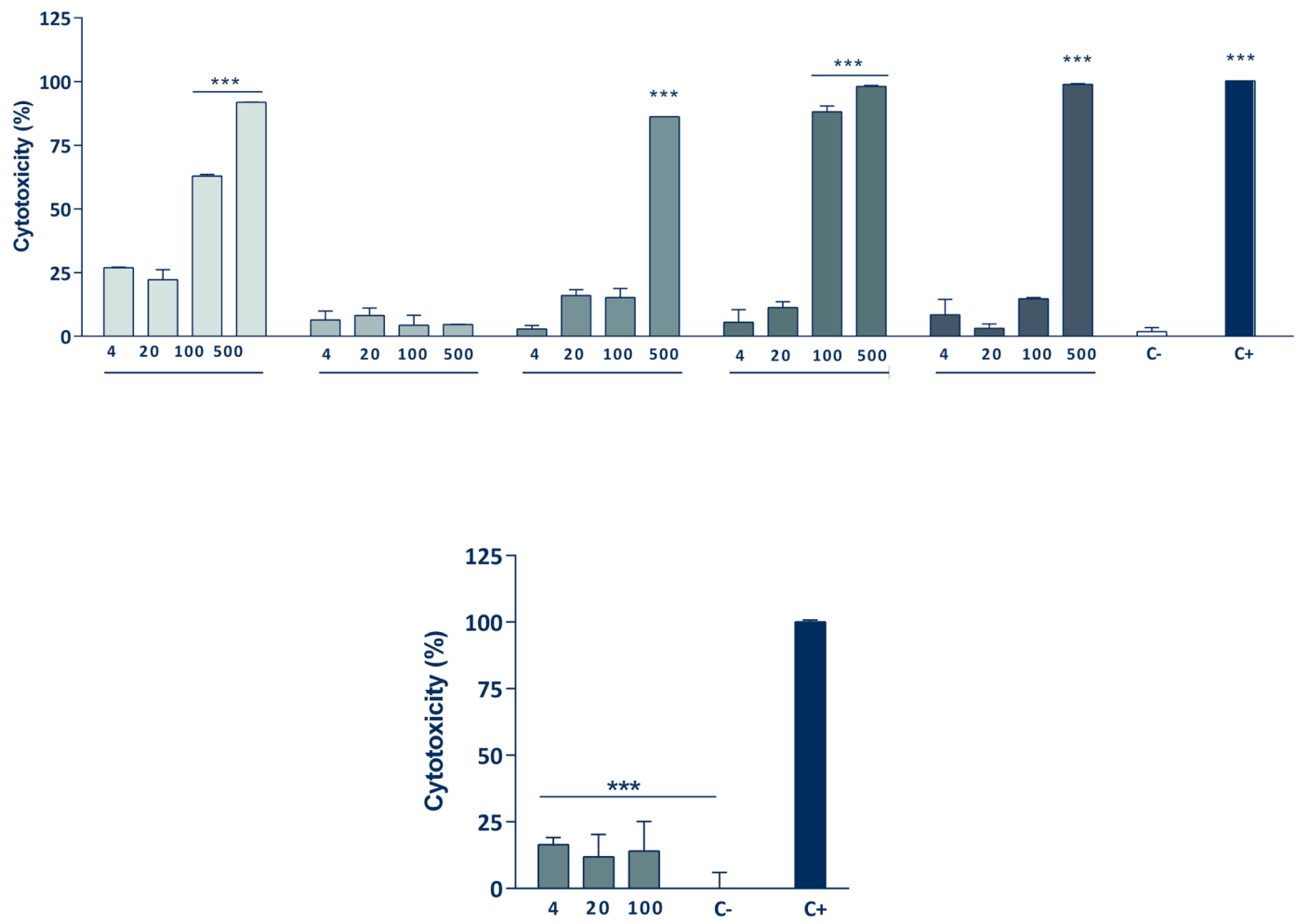


Fig. 1. Relative cytotoxicity of the extract and fractions of *E. astringens* evaluated in the cell cultures of macrophage-like RAW 264.7 cells and epithelial Vero cells. (A) RAW 264.7 cells were stimulated by LPS and treated with the *E. astringens* samples (4, 20, 100, and 500 µg/ml) for 24 h. (B) Vero cells were plated and treated with the *E. astringens* Hex fraction (4, 20, and 100 µg/ml) for 24 h. After incubation, cell viability was measured by the MTT test. Untreated cells were used as a negative control (C-) and the cells treated with 1% of Triton X-100 were used as a positive control of 100% cytotoxicity (C+). Arithmetic means \pm standard deviation. $P < 0.001$ (***) in relation to the non-treated cells in each group ($n = 3$).

other *Eugenia* species against different bacteria species. On the other hand, the *E. astringens* Hex fraction showed notable inhibitory activity and lower MIC₅₀ values against *Mycobacterium* strains when compared to that described by Ferreira et al. (2014) in relation *E. calycina* Hex fraction that is also mainly composed of terpenes. A broad-spectrum bactericidal activity in same material is associated to the presence of wide variety active constituents. However, many antimicrobial compounds when active on Mtb are effective only at high concentrations due to the complex composition and thickness of the Mtb cell wall (Maitra et al., 2019). The predominance of terpenes in the chemical composition of *Eugenia* has been associated with antimicrobial activity, although the presence and concentration of these substances vary among different *Eugenia* species, different parts of the plant and extraction technique. Differences in bioactivity may be related to geographical and seasonal variations, yields and chemical variability and extraction technique utilized (Costa et al., 2020).

We can only speculate about active substances contributing to the observed antitubercular action of the *E. astringens* Hex fraction. In previous studies, sesquiterpenes, isolated from plants and other natural sources, have been reported as inhibitors of Mtb and other mycobacterial species (Salomon and Schmidt, 2012) and might be responsible for the activity of *E. astringens* Hex fraction against Mtb, since eudesmene (14.18%), caryophyllene (18.08%), cadinene (11.55%) and aromadendrane (9.48%) sesquiterpene-types are the most abundant in this

fraction (Table 1). The eudesmene-type sesquiterpenes isolated from endophytic *Streptomyces* sp. of *Kandelia candel*, kadinols A-E, showed activity against *M. vaccae* (Ding et al., 2012). The essential oils of *Lippia trifolia* and *L. fucata*, containing significant quantities of β -caryophyllene, 12.8% and 7.6%, respectively, exhibited activity against Mtb (Santana Julião et al. 2009). Additionally, viridiflorol and spathulenol, aromadendrene-type sesquiterpenes, detected in the Hex fraction of *E. astringens* in this study, previously were described for the antitubercular activity. The sesquiterpene viridiflorol isolated from *Allophylus edulis* essential oil (Trevizan et al., 2016) and the spathulenol, isolated from *Psidium guineense* (Do Nascimento et al., 2018), exhibited ability to inhibit growth of reference Mtb strain H37Rv. Of importance, the spathulenol isolated from an extract of *Azorella compacta* was twice more effective on drug-resistant clinical isolates of Mtb (MIC and MBC = 6.25 µg/ml) than the susceptible strain H37Rv (MIC and MBC = 12.5 µg/ml) (Dzul-Beh et al., 2019). In accordance with these data, the spathulenol isolated from *Ocotea notata* leaves has been shown to inhibit growth of *M. tuberculosis* strains, including the strain H37Rv and highly virulent clinical Mtb isolate M299 (MIC₅₀ 36.9 and 42.1 µg/ml, respectively), in the previous work of our group (Costa et al., 2020). Therefore, we suggest that the overall antitubercular effect of the Hex fraction of *E. astringens* might be associated with the presence of spathulenol, viridiflorol and other sesquiterpenes which can exhibit cumulative and/or synergistic antitubercular activity.

Table 3

Evaluation of the cytotoxic effects (IC₅₀) of *E. astringens* extract and its fractions on macrophage-like RAW 264.7 cells and epithelial Vero cells by MTT assay.

Samples	RAW 264.7 cellsIC ₅₀ (µg/mL)	Vero cellsIC ₅₀ (µg/mL)
Extract	91.1 ± 1.7	—
BuOH fraction	> 500	—
EtOAc fraction	215.4 ± 0.9	—
DCM fraction	49.7 ± 2.4	—
Hex fraction	214.8 ± 2.0	> 100

3.3. Evaluation of cellular toxicity of the extract and fractions of *E. astringens* in cell culture

The most of samples exhibited high cytotoxicity only at the highest concentrations tested (500 µg/ml) by exception of the BuOH fraction that was not toxic for the RAW264.7 cells (Fig. 1A). (IC₅₀ > 500 µg/ml). The EtOAc and Hex fractions presented relatively low toxicity, exhibiting an IC₅₀ value higher than 200 µg/ml (Table 3)

Among the fractions active against Mbv BCG and Mtb H37Rv strains (DCM and Hex fractions), the Hex fraction exhibited the lowest cell cytotoxicity. This fraction was additionally tested for cytotoxic effect in the culture of African monkey kidney epithelial cells (Vero ATCC® CCL-81™) in concentrations 4, 20, and 100 µg/ml (Fig. 1B). Very low cytotoxicity was demonstrated in all the concentrations tested, The Hex fraction was selected for the further study of antitubercular properties of *E. astringens*, in infected macrophages.

3.4. Effect of *n*-hexane fraction of *E. astringens* on the intracellular growth of BCG and H37Rv strains in macrophages and on the growth of hypervirulent *M. tuberculosis* strain M299 in broth

As shown in Fig. 2A, the Hex fraction was able to reduce the bacillary load in macrophages infected with Mbv BCG (MIC₅₀ 11.2 ± 1.2 µg/ml), resulting in a 61%, 85% and 100% inhibition at concentrations of 4, 20

and 100 µg/ml, respectively. In the cultures infected with Mtb H37Rv strain, the mycobacterial growth inhibition occurred mainly at concentrations of 20 and 100 µg/ml (MIC₅₀ 20.0 ± 1.2 µg/ml), resulting in 85% and 94% reduction of the CFU bacterial count compared to untreated controls. Nevertheless, it should be noted that the anti-TB drug, rifampicin was more active to inhibit the intracellular growth of Mbv BCG and Mtb H37Rv (Fig. 2A).

To further evaluate the antitubercular potential, the Hex fraction of *E. astringens* was tested against clinically relevant Mtb strain, belonging to the modern Beijing sub-lineage, that in our previous studies demonstrated increased virulence (Ribeiro et al., 2014; Almeida et al., 2017) and resistance to rifampicin (Ventura et al., 2015).

The Hex fraction, used at 20 and 100 µg/ml, potentially inhibited the growth of Mtb strain M299 (Fig. 2B), by 60% and 70%, respectively. It is important to note that the concentration of standard anti-TB drug, rifampicin, had to be increased at least ten-fold for the M299 (MIC₅₀ 5.3 ± 1.3 µg/ml) compared to that established for reference H37Rv strain (Table 2). In contrast, the MIC₅₀ of Hex fraction used for the treatment of M299 strain was lower than that established for the reference strain (Table 2 and Fig. 2B).

The obtained data demonstrate strong inhibitory activity of the *E. astringens* Hex fraction against Mtb growth in broth and in macrophages. To the best of our knowledge, this is the first report demonstrating antitubercular activity of *E. astringens* preparations. Selectivity of the observed antitubercular effect was not verified in this study. However, a recent study conducted by Farias et al. (2020) showed that the Hex fractions obtained from fruits or leaves of *E. umbelliflora* (sin. *E. astringens*) were able to inhibit growth of *S. aureus* (MIC 15–30 mg/ml), with no activity against *E. coli* and *C. albicans*. These data suggest that the Hex fraction exhibiting antitubercular effects in our study, can be active against some gram-positive bacteria as well. Some of the active substances composing Hex fractions could act on the common targets in various gram-positive bacteria, including mycobacteria, but also do not exclude the presence of substances with the selective action.

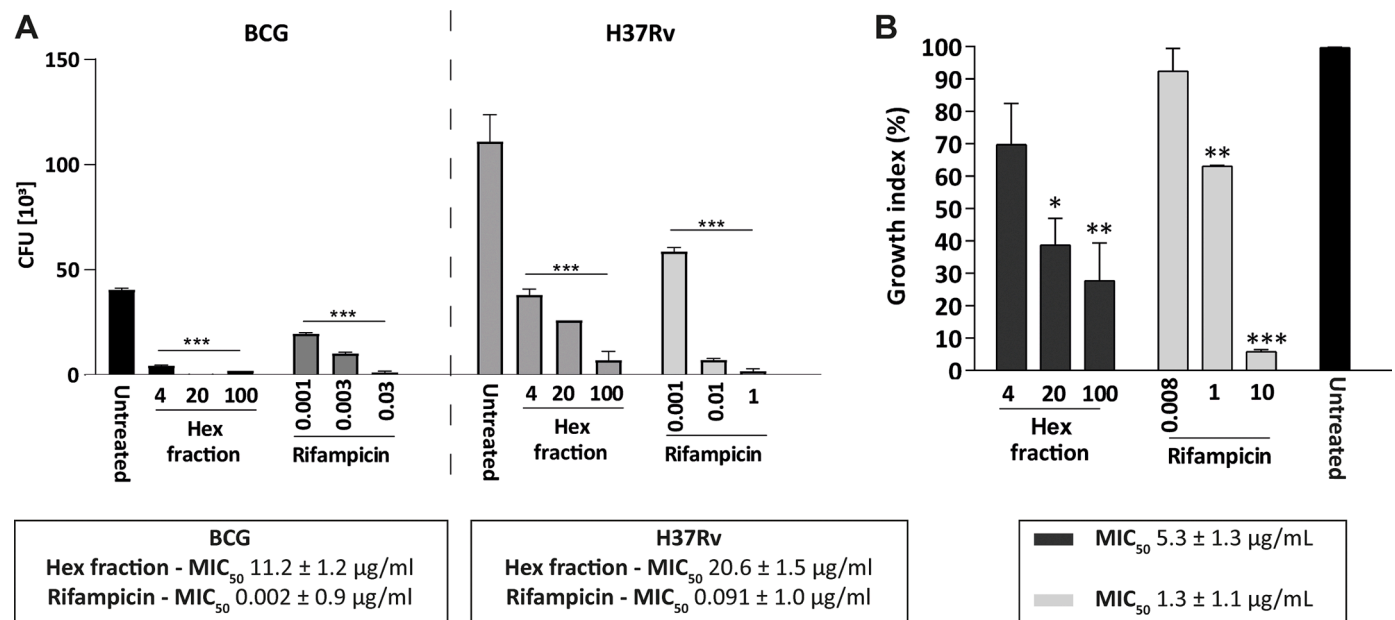


Fig. 2. Inhibitory effect of Hex fraction of *E. astringens* on the intracellular growth of BCG and Mtb H37Rv strains in macrophages (A) and the growth of hypervirulent Mtb strain M299 in broth culture (B). (A) RAW 264.7 macrophages were infected with BCG or Mtb H37Rv strains at the infection ratio of 1:1 and treated with the Hex fraction (4, 20, and 100 µg/ml) or rifampicin (0.001, 0.003 and 0.03 µg/ml for BCG and 0.001, 0.01 and 1 µg/ml to H37Rv) for 4 days. As a positive control for mycobacterial growth, untreated Mbv BCG and Mtb H37Rv strain was used. Bacterial viability was determined by counting of CFU in the macrophage lysates obtained on day 4. (B) Hypervirulent Mtb strain M299 was plated in wells (1×10^6 CFU/well) and treated with the Hex fraction (4, 20, and 100 µg/ml) or rifampicin (0.008, 1 and 10 µg/ml) or left untreated for 5 days. As a positive control for growth, untreated Mtb M299 strain was used. The MTT method was used to evaluate mycobacterial growth, and the growth value in untreated cultures was attributed 100%. Relative values are means ± standard deviation ($n = 2$). $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***), compared with the untreated group.

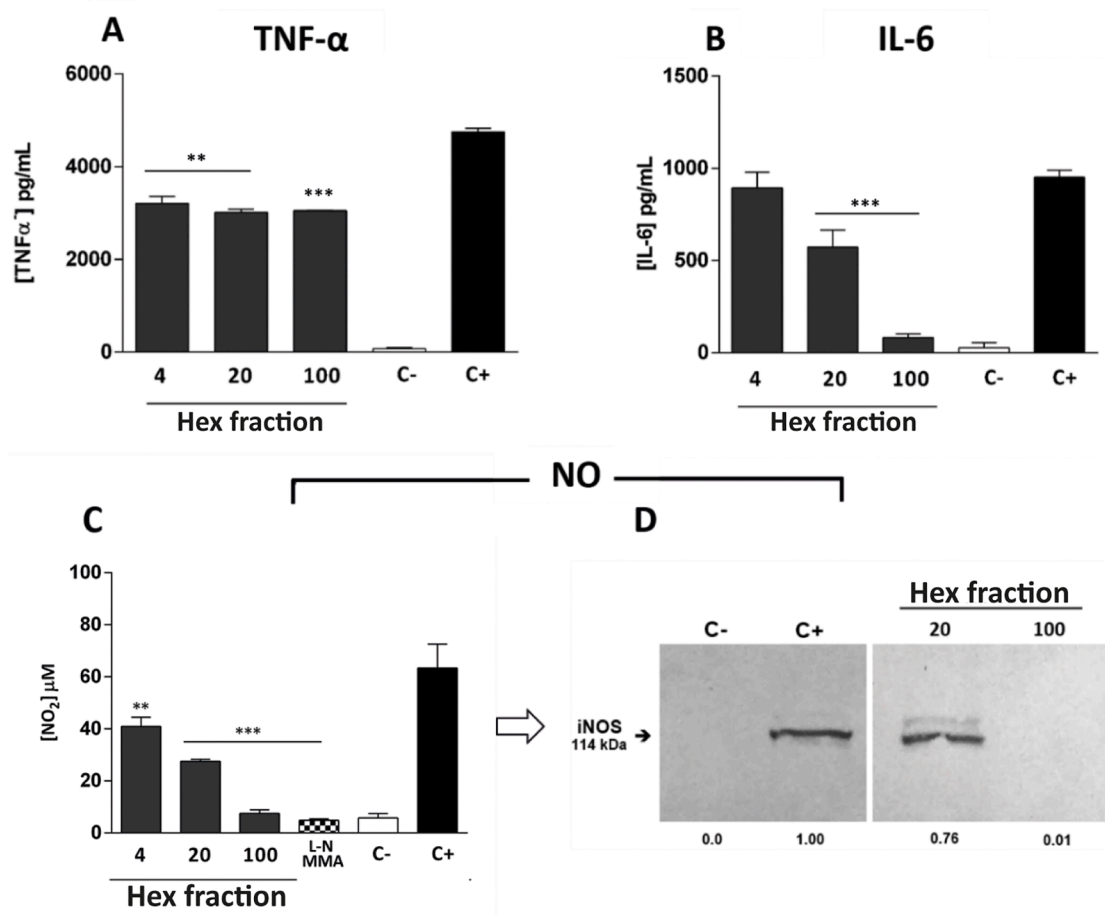


Fig. 3. Immunomodulatory effect of Hex fraction from *E. astringens* on RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS. Cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and treated with the Hex fraction (4, 20, and 100 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. Then, the culture supernatants and the cells were collected for quantification of inflammatory mediators, TNF- α , IL-6, and NO, and iNOS expression in macrophages, respectively. (A) TNF- α production was measured by the L929 fibroblast viability indirect bioassay. (B) IL-6 production was measured by ELISA. (C) NO production was measured by the Griess method. Treatment with L-NMMA was used as a control to inhibit NO production. (D) iNOS expression was evaluated by Western blot. Lower panel, quantification of the protein levels by densitometric analysis of the immunoreactive bands was inserted. Each band was compared to positive control band (C+), and the value for the positive control set to 1. (A–D) Non-stimulated and untreated macrophages were used as a negative control (C-) and macrophages stimulated with LPS were used as a positive control (C+). Values are mean \pm standard deviation. All test values were compared with the C+ value. $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***). ($n = 3$).

Further fractionation and testing for selective antitubercular action may result in isolation of active compounds or most active sub-fractions grouping active compounds with cumulative effect.

3.5. Immunomodulatory effect of *E. astringens* hex fraction on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages

The second step of this work was to investigate the immunomodulatory effect of the Hex fraction assessed through the production of TNF- α , IL-6 and NO by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

TNF- α and IL-6 are important inflammatory cytokines produced by activated macrophages and T cells (Balkwill and Mantovani, 2001). These cytokines are essential for the innate defense of the host against mycobacteria during the early stage of infection. Macrophages activated by cytokines or microbial compounds, such as LPS, produce nitric oxide (NO) (Macmicking et al., 1997). It is an important inflammatory mediator, responsible for the death of mycobacteria, also acting as a vasodilator, leukocyte recruiter, and inducer of apoptosis (Bogdan et al., 2001). However, high levels of TNF- α , IL-6, and NO contribute to pathogenesis of severe progressive TB, promoting pulmonary infiltration with inflammatory leukocytes, necrotic cell death and tissue damage (Santiago-Carvalho et al., 2021).

As shown in Fig. 3, Hex fraction inhibited TNF- α production by the

LPS-stimulated macrophages at all concentrations tested, causing 77% inhibition by the higher concentration (IC_{50} 58.0 \pm 1.7 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 3A). The TNF- α inhibition may be related to the presence of the compound (*E*)-bisabol-11-ol (Table 1), which has already been shown to reduce TNF- α in the peritoneal cavity of animals with carrageenan-induced inflammation (Rocha et al., 2011). The effect of the Hex fraction on production of IL-6 (IC_{50} 15.3 \pm 1.0 $\mu\text{g/ml}$) and NO (IC_{50} 25.6 \pm 1.4 $\mu\text{g/ml}$) was even stronger, reaching more than 90% inhibition at 100 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3B and 3C). The inhibitory effect of the Hex fraction on NO production was stronger than that of a known nonselective inhibitor of induced nitric oxide synthase, L-NMMA (IC_{50} 32.3 \pm 1.5 $\mu\text{g/ml}$). The inhibitory activities of the Hex fraction were not related to its cytotoxicity to macrophages, as the cytotoxic concentration was higher than the active one (Table 3).

To study the mechanism of NO inhibition by Hex fraction, we evaluated the iNOS expression in macrophages treated with LPS and Hex fraction by Western blot. NO is biosynthesized by inducible nitric oxide synthase (iNOS) from L-arginine in macrophages activated by proinflammatory stimuli (Perez and Laughon, 2015), therefore, inhibition of the expression or enzymatic activity of iNOS may reduce production of NO and its cytotoxic effects in tissues (Guzik et al., 2003).

The concentration range in which Hex fraction inhibited NO production (20 and 100 $\mu\text{g/ml}$) was used to study its effects on iNOS

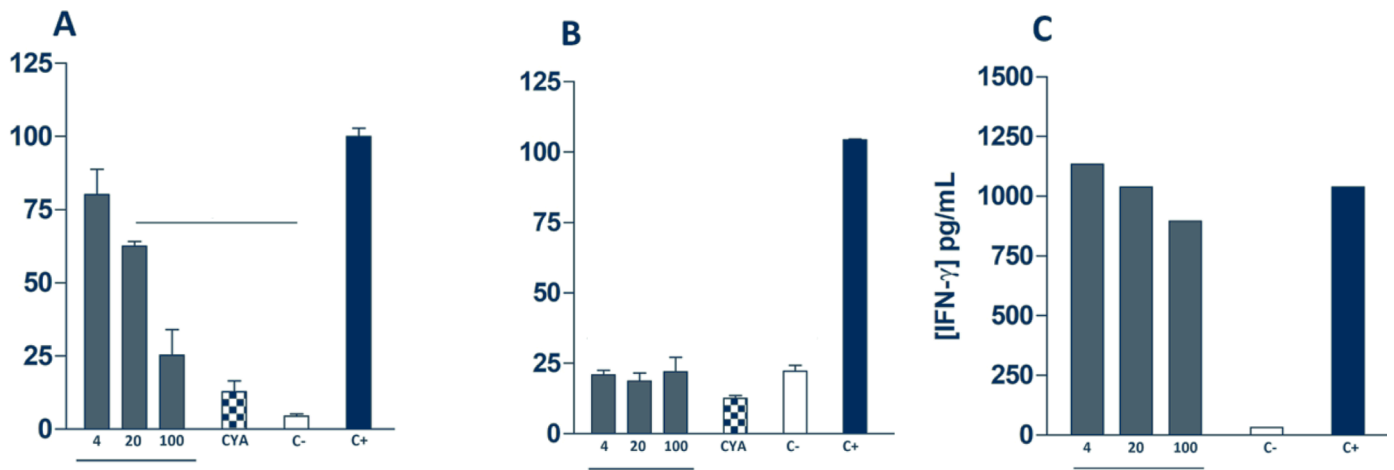


Fig. 4. The effects of Hex fraction from *E. astrigenes* on proliferation and IFN- γ production by PHA-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. Donor peripheral blood PBMC were obtained by Ficoll gradient centrifugation. After separation, the cells were plated (1×10^6 cells/ml), stimulated with PHA (5 μ g/ml), and treated with Hex fraction (4, 20, and 100 μ g/ml). After 5 days, (A) cell proliferation was measured by MTT assay, (B) cell viability was verified by Trypan blue exclusion test, and (C). IFN- γ production was measured in the culture supernatant by ELISA. Cyclosporin (CYA), an immunosuppressive drug, was used to inhibit the proliferation of PHA-stimulated cells and used as an additional control in the proliferation test. Unstimulated and untreated cells were used as a negative control (C-) and untreated PHA-stimulated cells were used as a positive control (C+). Values are mean \pm standard deviation. $P < 0.001$ (***). ($n = 3$).

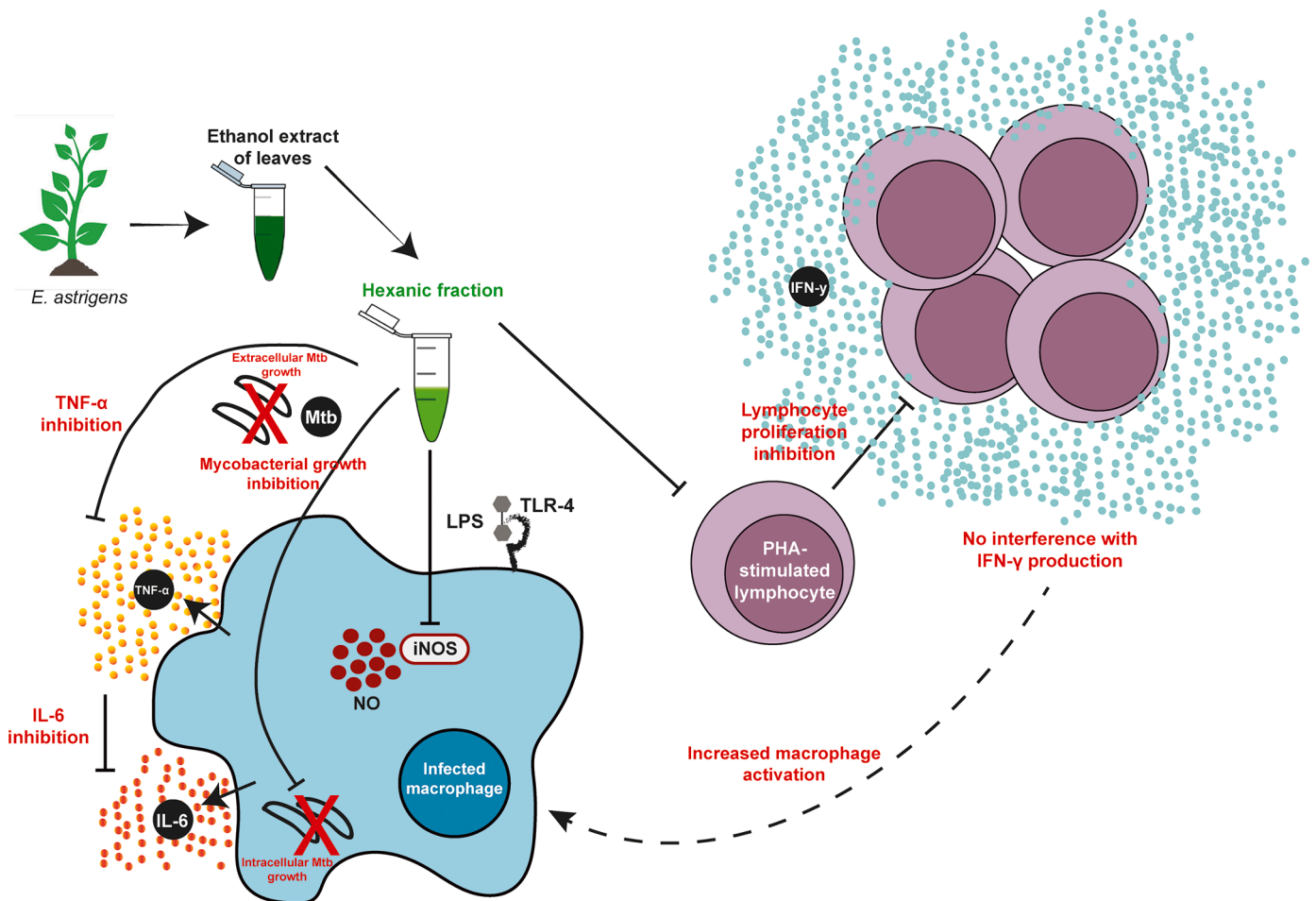


Fig. 5. Schematic illustration showing the antitubercular and immunomodulatory effects of the Hex fraction from *E. astrigenes*. The Hex fraction from the ethanolic extract of leaves of the plant species *E. astrigenes* was selectively active in inhibiting the intracellular growth of mycobacterial strains of different virulence levels. The fraction also showed strong immunomodulatory potential, inhibiting the production of TNF- α , IL-6, NO and inhibition of lymphocyte proliferation. Therefore, the Hex fraction from *E. astrigenes* is a promising source for the isolation of active substances for the dual treatment of severe tuberculosis.

expression. The Hex fraction almost completely inhibited iNOS expression at 100 µg/ml and when used at the lower concentration, the iNOS expression was reduced by about 30% (Fig. 3D). These results demonstrated that the inhibitory effect of Hex fraction on NO production by macrophages (Fig. 3C) was mediated by suppression of iNOS expression.

Recently, anti-inflammatory properties of *E. astringens* were demonstrated in the carrageenan-induced inflammation model in mice (Goldoni et al., 2019). A methanolic extract obtained from the leaves of *E. astringens* (*E. umbelliflora*) reduced polymorphonuclear cell infiltration and formation of non-haemorrhagic fibrin exudates through the inhibition of IL-1β production in this model.

Various compounds found in the Hex fraction of *E. astringens* in this study were previously described as potent anti-inflammatory substances. The compound spathulenol, (Table 1), previously was detected by our group in the Hex fraction from *Ocotea notata* leaves, and its activity in inhibition of NO production by macrophages was demonstrated (Costa et al., 2020). Additionally, Do Nascimento et al. (2018) showed significant inhibition of inflammation in murine models of carrageenan-induced paw edema and pleurisy in mice treated with spathulenol isolated from essential oil and extracts from the leaves of *Psidium guineense*. The same models of carrageenan-induced inflammation were used by Trevizan et al. (2016) to demonstrate anti-inflammatory effects of the viridiflorol isolated from essential oil of *Allophylus edulis* leaves. Remarkably, in all these studies (Costa et al., 2020; Nascimento et al. 2018; Trevizan et al., 2016), anti-inflammatory effects were studied along with the antitubercular activity of isolated from plants spathulenol and viridiflorol, demonstrating that these agents exhibited dual activity, anti-inflammatory and antitubercular. These data suggest that the presence of spathulenol and viridiflorol in the Hex fraction of *E. astringens* may contribute to the inhibitory effects on production of proinflammatory mediators by stimulated macrophages, as well as to the antitubercular activity, observed in our study.

3.6. Inhibitory effect of *E. astringens* hex fraction on mitogen-stimulated proliferation and IFN-γ production by human lymphocytes

We also evaluated the effect of the Hex fraction on mitogen-stimulated lymphocyte proliferation and IFN-γ production. Peripheral blood lymphocytes are crucial in the response against mycobacteria. T cells are able to respond specifically on mycobacterial antigens and non-specifically to the mitogens, such as phytohemagglutinin, PHA, exhibiting high levels of proliferation and production of IFN-γ and other cytokines (Datta and Sarvetnick, 2009).

Hex fraction was able to reduce PHA-induced proliferation of the PBMC isolated from healthy donors up to 84% (IC₅₀ 28.7 ± 4.5 µg/ml) (Fig. 4A). The viability of PBMC cells was monitored by trypan blue exclusion test, demonstrating 95% of Trypan blue-negative cells throughout the course of experiment (IC₅₀ > 100 µg/ml) (Fig. 4B). These data discard possible contribution of cytotoxicity to the inhibitory effect of Hex fraction on lymphocyte proliferation. Some of compounds found in the Hex fraction of *E. astringens* (Table 1) were demonstrated to inhibit lymphocyte proliferation in previous studies. Thus, a tricyclic sesquiterpene, copaene, exhibited direct immunosuppressive activity on the human PHA-stimulated lymphocytes in vitro (Türkez et al., 2014). Remarkably, the treatment with Hex fraction had no significant effect on production of IFN-γ by the PHA-stimulated lymphocytes (IC₅₀ > 100 µg/ml). This observation is important, since IFN-γ, produced by activated lymphocytes, is one of the main protective factors against pathogenic mycobacteria. This cytokine activates macrophages to kill intracellular mycobacteria, promotes in synergy with TNF-α granuloma formation and acts as a negative regulator of deleterious IL-17-driven responses to mycobacteria that are associated with excessive neutrophil recruitment and consequent tissue damage (Almeida et al., 2017; Santiago-Carvalho et al., 2021).

4. Conclusion

The Hex fraction obtained from the leaves of *E. astringens* exhibited strong antitubercular potential, inhibiting growth of *M. tuberculosis* strains in bacterial culture and in the infected macrophages. Additionally, the Hex fraction suppressed production of proinflammatory mediators by stimulated macrophages and inhibited mitogen-stimulated T cell proliferation without interference with IFN-γ production (Fig. 5). The described properties may be related to the major compounds composing the Hex fraction, presented mainly by sesquiterpenes. Some of these compounds, such as spathulenol and viridiflorol isolated from other plants, were previously described for antitubercular and anti-inflammatory activities. It is possible that the overall biological efficiency of the Hex fraction depends on the cumulative and/or synergistic effect of these compounds and other sesquiterpenes. Thus, the Hex fraction of *E. astringens* is an important source of new compounds with dual, antitubercular and immunomodulatory activities, encouraging isolation and further investigation of the therapeutic effects of these compounds in animal models of severe pulmonary TB.

5. Author contributions

All data were generated in-house, and no paper mill was used. All authors agree to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy.

6. Credit authorship contribution statement

Igor Santiago-Carvalho: . **Thatiana Lopes Biá Ventura Simão**: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation and writing. **Sanderson Dias Calixto**: Methodology, Validation, Investigation. **Thalissa Cozentino de Albuquerque**: Methodology and Investigation. **Tatiana Ungaretti Paleo Konno**: Investigation. **Rafael Moysés Salgado**: Investigation. **Michelle Frazão Muzitano**: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation and writing. **Shaft Corrêa Pinto**: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation and writing. **Elena Lasunskaja**: Conceptualization, Methodology, Supervision, Project administration and Funding acquisition.

7. Funding sources

This work was supported by grant (E-26/211.648/2015) from the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ).

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

To the financial support of FAPERJ (Brazil). To Hemanoel Passarelli-Araujo for providing language help. We gratefully acknowledge the technical assistance of Verônica Rodrigues Lanes and Rita de Cássia Mothé Escocard for providing excellent assistance in experiments.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.phyplu.2022.100236.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, p. 456.
- Almeida, F.M., Ventura, T.L.B., Amaral, E.P., Ribeiro, S.C., Calixto, S.D., Manhaes, M.R., Rezende, A.L., Souza, G.S., de Carvalho, I.S., Silva, E.C., Silva, J.A.D., 2017. Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain triggers necrotic lung pathology

- associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. *PLoS ONE* 12 p.e0173715.
- Angiosperm Phylogeny Group, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 105–121.
- Apel, M.A., Limberger, R.P., Sobral, M., Henriques, A.T., Ntalani, H., Vérin, P., Menut, C., Bessiére, J.M., 2002. Chemical composition of the essential oils from southern Brazilian *Eugenia* species. Part III. *J. Essent. Oil Res.* 14, 259–262.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357 (9255), 539–545.
- and Bertucci, A., Olivaro, C., Silva, P.A.D., Ramos, D., Cerdeiras, M.P., Vázquez, A., 2009. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. *Ver. Bras. Farmacogn.* 19, 20–25.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2, 907–916.
- Chavasco, J.M., Felipe, P.E., Muniz, B.H., Cerdeira, C.D., Leandro, F.D., Coelho, L.F.L., Silva, J.J.D., Chavasco, J.K., Dias, A.L.T., 2014. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. *Rev. Inst. Med. Trop. SP* 56, 13–20.
- Chen, H., Nyantakyi, S.A., Li, M., Gopal, P., Aziz, D.B., Yang, T., Moreira, W., Gengenbacher, M., Dick, T., Go, M.L., 2018. The mycobacterial membrane: a novel target space for anti-tubercular drugs. *Front. Microbiol.* 9, 1627.
- Cronquist, A., Takhtadzhian, A.L., 1981. *An integrated system of classification of flowering plants.* Columbia University Press.
- and Da Costa, J.S., da Cruz, E.D.N.S., Setzer, W.N., da Silva, J.K.D.R., Maia, J.G.S., Figueiredo, P.L.B., 2020. Essential oils from Brazilian *Eugenia* and *Syzygium* species and their biological activities. *Biomolecules* 10, 1155.
- Dashti, Y., Grkovic, T., Quinn, R.J., 2014. Predicting natural product value, an exploration of anti-TB drug space. *Nat. Prod. Rep.* 31, 990–998.
- Datta, S., Sarvetnick, N., 2009. Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases. *Trends in immunology* 30 (9), 430–438.
- Ding, L., Maier, A., Fiebig, H.H., Lin, W.H., Peschel, G., Hertweck, C., 2012. Kandenols A–E, eudesmanes from an endophytic *Streptomyces* sp. of the mangrove tree *Kandelia candel.* *J. Nat. Prod.* 75, 2223–2227.
- Do Nascimento, K.F., Moreira, F.M.F., Santos, J.A., Kassuya, C.A.L., Croda, J.H.R., Cardoso, C.A.L., do Carmo Vieira, M., Ruiz, A.L.T.G., Foglio, M.A., de Carvalho, J.E., Formagio, A.S.N., 2018. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and *spathulenol.* *J. Ethnopharmacol.* 210, 351–358.
- Dzul-Beh, A., García-Sosa, K., Uc-Cachón, A.H., Bórquez, J., Loyola, L.A., Barrios-García, H.B., Peña-Rodríguez, L.M., Molina-Salinas, G.M., 2019. In vitro growth inhibition and bactericidal activity of *spathulenol* against drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis.* *Rev. Bras. Farmacogn.* 29, 798–800.
- Falcão, T.R., de Araújo, A.A., Soares, L.A.L., de Moraes Ramos, R.T., Bezerra, I.C.F., Ferreira, M.R.A., de Souza Neto, M.A., Melo, M.C.N., de Araújo, R.F., de Aguiar Guerra, A.C.V., de Medeiros, J.S., 2018. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. *BMC Complem. Altern. M* 18, 1–12.
- Faqueti, L.G., Farias, I.V., Sabetot, E.C., Delle Monache, F., San Feliciano, A., Schuquel, I. T.A., Cechinel-Filho, V., Bella Cruz, A., Meyre-Silva, C., 2015. Macrocarpal-like compounds from *Eugenia umbelliflora* fruits and their antibacterial activity. *J. Agr. Food Chem.* 63, 8151–8155.
- and Farias, I.V., Amorim, C.M.D., Graff, E., Breia, I., Dos Santos, M.C., Norberto, S., Faqueti, L.G., Bresolin, T.M.B., Bella Cruz, A., Meyre-Silva, C., 2020. Improvement in phloroglucinol compound extracted from different parts of *Eugenia umbelliflora* monitored by LC-UV and antimicrobial activity. *Nat. Prod. Res.* 1–4.
- Ferreira, F.P., Morais, S.R., Bara, M.T., Conceição, E.C., Paula, J.R., Carvalho, T.C., Vaz, B.G., Costa, H.B., Romão, W., Rezende, M.H., 2014. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 99, 89–96.
- Figueiredo, P.L.B., Pinto, L.C., da Costa, J.S., da Silva, A.R.C., Mourão, R.H.V., Montenegro, R.C., da Silva, J.K.R., Maia, J.G.S., 2019. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. *J. Ethnopharmacol.* 232, 30–38.
- Guzik, T., Korbust, R., Adamek-Guzik, T., 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation. *J. Physiol. Pharmacol.* 54, 469–487.
- Goldoni, F.C., Barretta, C., Nunes, R., Broering, M.F., De Faveri, R., Moller, H.T., Corrêa, T.P., Farias, I.V., Amorim, C.K., Pastor, M.V.D., Meyre-Silva, C., 2019. Effects of *Eugenia umbelliflora* O. Berg (Myrtaceae)-leaf extract on inflammation and hypersensitivity. *J. Ethnopharmacol.* 244, 112133.
- Hunter, R.L., 2011. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis* 91, 497–509.
- Legrand, D.C., Klein, R.M., 1969. *Mirtáceas.* In: reitz R (org.). *Flora ilustrada catarinense.* Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Machado, K.E., Filho, V.C., Tessarolo, M.L., Mallmann, R., Meyre-Silva, C., Bella Cruz, A., 2005. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora.* *Pharm. Biol.* 43, 636–639.
- Machado, K.E., Filho, V.C., Cruz, R.C., Meyre-Silva, C., Cruz, A.B., 2009. Antifungal activity of *Eugenia umbelliflora* against dermatophytes. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1181–1184.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350.
- Magina, M.D., Dalmarco, E.M., Wisniewski, A., Simionatto, E.L., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. *J. Nat. Med.* 63, 345–350.
- Magina, M.A., Gilioli, A., Moresco, H.H., Colla, G., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M., 2010. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Lat. Am. J. Pharm.* 29, 376–382.
- and Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, L.T., Vollmer, W., Keep, N.H., Bhakta, S., 2019. Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: an Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *Fems Microbiol. Ver* 43, 548–575.
- Meyre-Silva, C., Petry, C.M., Berté, T.E., Becker, R.G., Zanatta, F., Delle-Monache, F., Cechinel-Filho, V., Andrade, S.F., 2009. Phytochemical analyses and gastroprotective effects of *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) on experimental gastric ulcers. *Nat. Prod. Commun.* 4, 911–916.
- Orme, I.M., Basaraba, R.J., 2014. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Semin. Immunol.* 26, 601–609.
- Palucci, I., Delogu, G., 2018. Host directed therapies for tuberculosis: futures strategies for an ancient disease. *Chemoth* 63, 172–180.
- Perez, K.M., Laughon, M., 2015. Sildenafil in term and premature infants: a systematic review. *Clin. Ther.* 37, 2598–2607.
- Queiroz, J.M.G.D., Suzuki, M.C.M., Motta, A.P.R., Nogueira, J.M.R., Carvalho, E.M.D., 2015. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. *Rev. Fitos* 9, 73–159.
- Revilla, J., 2002. *Plantas Úteis da Bacia Amazônica.* INPA, Rio de Janeiro.
- Ribeiro, S.C., Gomes, L.L., Amaral, E.P., Andrade, M.R., Almeida, F.M., Rezende, A.L., Lanes, V.R., Carvalho, E.C., Suffys, P.N., Mokrousov, I., Lasunskaja, E.B., 2014. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2615–2624.
- Rocha, N.F.M., Rios, E.R.V., Carvalho, A.M.R., Cerqueira, G.S., de Araújo Lopes, A., Leal, L.K.A.M., Dias, M.L., de Sousa, D.P., de Sousa, F.C.F., 2011. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (–)- α -bisabolol in rodents. *N.S. Arch. Pharmacol.* 384, 525–533.
- Salomon, C., Schmidt, L., 2012. Natural products as leads for tuberculosis drug development. *Curr. Top. Med. Chem.* 12, 735–765.
- Santana Julião, L., Bizzo, H.R., Souza, A.M., Lourenço, M.C.S., Silva, P.E.A., Tavares, E. S., Rastrelli, L., Leitão, S.G., 2009. Essential oils from two *Lantana* species with antimycobacterial activity. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1733–1736.
- Santiago-Carvalho, I., Almeida-Santos, G.D., Bomfim, C.C.B., Souza, P.C.D., Melo, B.M.S. D., Amaral, E.P., Cione, M.V.P., Lasunskaja, E., Hirata, M.H., Alves-Filho, J.C.F., Nakaya, H.L., 2021. P2X7 receptor signaling blockade reduces lung inflammation and necrosis during severe experimental tuberculosis. *Front. Cell Infect. Mi.* 11, 385–396.
- Santos, M.G., Fevereiro, P.C.A., Reis, G.L., Barcelos, J.I., 2009. Recursos vegetais da restinga de Carapebus, Rio de Janeiro. *Brasil. Rev. Biol. Neotrop.* 6, 35–54.
- Trevizan, L.N.F., do Nascimento, K.F., Santos, J.A., Kassuya, C.A.L., Cardoso, C.A.L., do Carmo Vieira, M., Moreira, F.M.F., Croda, J., Formagio, A.S.N., 2016. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of viridiflorol: the major constituent of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. *J. Ethnopharmacol.* 192, 510–515.
- and Türköz, H., Çelik, K., Toğar, B., 2014. Effects of copaene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells in vitro. *Cytotechnol* 66 (4), 597–603.
- Ventura, T.L.B., Calixto, S.D., Abraham-Vieira, B.D.A., Souza, A.M.T.D., Mello, M.V.P., Rodrigues, C.R., De Souza, R.O.M.A., Leal, I.C.R., Lasunskaja, E.B., Muzitano, M.F., 2015. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. *Molecules* 20, 8072–8093.
- World Health Organization, 2020. *Global tuberculosis report 2020.*
- Young, C., Walzl, G., Du Plessis, N., 2020. Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* 13 (2), 190–204.
- De Souza AM, Camila Freitas de Oliveira, Vinícius Bednarczuk de Oliveira, Fernando Cesar Martins Betim, Obdulio Gomes Miguel, Marilis Dallarmi Miguel Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species – A Review. *Planta Med* 2018; 84: 1232–1248.