CAIO CÉSAR BARBOSA BOMFIM

**Papel do receptor P2X7 na modulação da resposta
imune pulmonar induzida por micobactérias
hipervirulentas**

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

São Paulo
2014

CAIO CÉSAR BARBOSA BOMFIM

**Papel do receptor P2X7 na modulação da resposta
imune pulmonar induzida por micobactérias
hipervirulentas**

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

Área de concentração: Imunologia

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

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Bomfim, Caio César Barbosa.

Papel do receptor P2X7 na modulação da resposta imune pulmonar induzida por micobactérias hipervirulentas / Caio César Barbosa Bomfim. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Tuberculose.

Versão do título para o inglês: Role of P2X7 receptor in modulation of lung immune response induced by hypervirulent mycobacteria.

1. Tuberculose 2. Resposta imune 3. Microbactérias hipervirulentas
4. Lesão tecidual 5. ATP 6. Receptor P2X7 I. Lima, Profa. Dra.
Maria Regina D'Império II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III.
Título.

ICB/SBIB0198/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caio César Barbosa Bomfim.

Título da Dissertação: Papel do receptor P2X7 na modulação da resposta imune pulmonar induzida por micobactérias hipervirulentas.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP Telefone : (55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.019/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 153/11/CEUA, aprovado em 31.10.11, e por solicitação da Profa. Dra. **Maria Regina D'Império Lima**, coordenadora da linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de **Caio César Barbosa Bomfim** ao Projeto de Pesquisa "*Papel da ativação dos inflamassomas no desenvolvimento da patogenia da tuberculose induzida por isolados clínicos hipervirulentos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 21 de março de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 127.2013-P444

São Paulo, 11 de dezembro de 2013.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 09 de dezembro de 2013, **tomou ciência** do projeto de pesquisa **"Papel da ativação dos inflamassomas no desenvolvimento da patogenia da tuberculose induzida por isolados clínicos hipervirulentos"** (Protocolo CEUA nº 444), o qual foi avaliado e aprovado pela CEUA do Instituto Ciências Biomédicas da USP (CEUA/ICB 153/11).

Cordialmente,

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).
Caio César Barbosa Bomim
Supervisor(a): Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
FCF/USP

Aos meu pais, Elcio e Cícera

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos que tem me propiciado até o momento.

Aos meus pais, por todo ensinamento e dedicação. O motivo real de cada vitória minha conquistada são eles, que sempre acreditaram em mim e se empenharam nas minhas lutas.

Às minhas irmãs Vanessa, Letícia e Larissa, por todo carinho e por tornarem meus dias mais divertidos e alegres.

Ao tio Edgar, por me acolher em seu lar, e a Tia Lia pelos incentivos durante todo esse tempo. Ambos foram muito importantes e contribuíram bastante para essa conquista.

Aos primos Eduardo, Natália e Rafael, pela compreensão e por todo apoio.

À toda minha família que sempre torce por mim.

Ao meu grande amigo Paulo Victor, pela amizade ímpar e parceria, pelos momentos de distração e diversão em meio essa correria do mestrado. Formamos uma grande dupla.

À minha orientadora Maria Regina, pela orientação desse trabalho e por contribuir imensamente com meu amadurecimento profissional.

Ao meu parceiro de laboratório NB3, Eduardo Amaral, amigo para todos os tempos, o qual me ensinou muito sobre tuberculose e técnicas laboratoriais, por ter me ajudado com os meus experimentos sempre que precisei, pelas discussões de resultados, e por me dar forças para continuar trilhando esse caminho da pesquisa.

Aos demais companheiros de laboratório: Rosane, Érica, Maria, Alê, Flávia, Henrique, Raissa, Danny, Paulo César e Rogério pela convivência diária, amizade, e por vários momentos agradáveis que passamos juntos.

Aos meus amigos Rafa e Bia, também companheiros de laboratório, pelos momentos de distração e diversão que me animam e me incentivam a ver a vida de

uma forma mais descontraída, e por me darem forças para continuar trilhando esse caminho da pesquisa.

Ao professor Mário Hirata, da faculdade de Ciências Farmacêuticas, por ter concedido o seu laboratório NB3 para execução dos meus experimentos.

Ao professor Pepe, por também ter colaborado com o meu projeto.

Aos demais professores e funcionários do departamento de imunologia.

À FAPESP e à USP pelo apoio financeiro.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, sob orientação da prof^a. Dr^a. Maria Regina D'Império Lima, em colaboração com o 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 Hirouyuki Hirata. O presente projeto recebeu auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) projeto número 2012/22587-0, do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

**“A parte que ignoramos é
muito maior que tudo quanto
sabemos”.**

Platão

RESUMO

BOMFIM, C. B. B. **Papel do receptor P2X7 na modulação da resposta imune pulmonar induzida por micobactérias hipervirulentas.** 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Mycobacterium* que acomete principalmente o sistema respiratório. Cepas hipervirulentas de micobactérias (MP287/03 – *Mycobacterium bovis*; Beijing 1471 – *Mycobacterium tuberculosis*) induzem distintos padrões de resposta imune. Uma forte resposta pró-inflamatória é observada no pulmão dos animais infectados com a cepa Beijing 1471, enquanto camundongos infectados com a cepa MP287/03 apresentam um perfil anti-inflamatório. O receptor P2X7 (P2X7R) é um sensor de ATP extracelular, uma molécula associada ao dano que é liberada a partir de células necróticas. O nosso grupo mostrou, recentemente, que a TB induzida por ambas as cepas Beijing 1471 e MP287/03 é atenuada em camundongos deficientes do P2X7R (P2X7RKO). Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o papel do P2X7R na resposta imune da TB severa induzida por essas cepas hipervirulentas em modelo murino. A estirpe H37Rv (*M. tuberculosis*) também foi usada como cepa padrão de virulência. Inicialmente, notamos que os animais P2X7RKO infectados com as cepas hipervirulentas apresentaram menos células infiltradas no pulmão do que os C57BL/6 infectados com as mesmas cepas. Realizamos então a fenotipagem dessas células e observamos que os animais C57BL/6 infectados com a cepa *Beijing* 1471 apresentaram grandes quantidades de células Ly6G⁺, F4/80^{High} e Ly6C⁺, que caracterizam neutrófilos, macrófagos e monócitos, respectivamente. Todavia, os animais P2X7RKO apresentaram menores números de células dessas três populações, indicando uma menor inflamação pulmonar. Já os camundongos C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 apresentaram uma única população com características semelhantes às células mieloides supressoras (CD11b⁺Ly6G^{inter}). Entretanto, os animais P2X7RKO, que foram infectados com essa mesma cepa, apresentaram as três populações observadas nas demais infecções (Ly6G⁺, F4/80^{High} e Ly6C⁺). Quando realizamos a fenotipagem da linhagem linfóide, percebemos que a cepa Beijing 1471 induzia forte ativação, com expressão de CD69, em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos C57BL/6, enquanto nos animais P2X7RKO houve diminuição da ativação desses linfócitos. No entanto, nos animais infectados com a cepa MP287/03 o contrário foi observado, ou seja, nos camundongos C57BL/6 houve baixa ativação de ambas populações de linfócitos, enquanto na linhagem P2X7RKO ocorreu uma maior ativação dessas células. Além do mais, as células infiltradas no pulmão dos animais P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 produziram menos IFN- γ (citocina pró-inflamatória) e mais IL-10 (citocina anti-inflamatória) em comparação com aquelas dos animais C57BL/6 infectados com a mesma cepa. Já o oposto foi observado nos camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03. Estes resultados são compatíveis com aqueles referentes ao perfil de ativação linfocitária. Os ensaios com camundongos quiméricos revelaram ainda que a expressão do P2X7R nas células derivadas da medula óssea é um importante fator associado com a TB severa. Diante do exposto podemos inferir que, apesar das diferenças na

capacidade imunomodulatória induzida pelos isolados clínicos Beijing 1471 e MP287/03, o P2X7R, expresso nas células originadas da medula óssea, exerce um papel deletério na TB severa. Além disso, concluímos que a ausência desse receptor restabelece a resposta imune pulmonar a perfis semelhantes ao induzido pela cepa H37Rv de menor virulência.

Palavras-chave: Tuberculose. Resposta imune. Micobactérias hipervirulentas. Lesão tecidual. ATP. Receptor P2X7

ABSTRACT

BOMFIM, C.B.B. **Role of P2X7 receptor in modulation of lung immune response induced by hypervirulent mycobacteria.** 2014. 90 p. Masters thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Mycobacterium* that mainly affect the respiratory system. Hypervirulent strains of mycobacteria (MP287/03 – *Mycobacterium bovis*; Beijing 1471 – *Mycobacterium tuberculosis*) induce distinct patterns of immune response in mice. A strong proinflammatory response is observed in the lung of mice infected with Beijing 1471 strain, while mice infected by MP287/03 strain have an anti-inflammatory profile. The P2X7 receptor (P2X7R) is a sensor of extracellular ATP, a damage-associated molecule that is released from necrotic cells. Our research group has shown that TB is attenuated in P2X7R deficient mice (P2X7RKO) that were infected with both Beijing 1471 and MP287/03 hypervirulent strains. Therefore, our aim was to investigate the role of the P2X7R in the immune response to TB induced by MP287/03 and Beijing 1471 strains, using as a model C57BL/6 and P2X7RKO mice. The H37Rv strain (*M. tuberculosis*) was used as a reference of virulence. At first, we have noted that P2X7RKO mice infected with hypervirulent strains had lesser cell infiltrates in the lung than C57BL/6 mice infected with the same strains. By phenotyping the cell infiltrates, we observed that C57BL/6 mice infected with Beijing 1471 strain had high numbers of Ly6G⁺ (neutrophils), F4/80⁺ (macrophages) and Ly6C⁺ (monocytes) cells. However, P2X7RKO mice had lower cell numbers of these three populations, indicating that these animals have lesser lung inflammation. In addition, C57BL/6 mice infected with MP287/03 strain showed a population with the characteristics of myeloid-derived suppressor cells (CD11b⁺Ly6G^{int}). However, P2X7RKO mice infected with this strain presented with the three population observed in the other infections (Ly6G⁺, F4/80^{high} and Ly6C⁺). When we performed the phenotypic analysis of lymphocytes, we noticed that Beijing 1471 strain induced stronger activation with CD69 expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells of C57BL/6 mice, while P2X7RKO mice had lower expression of this activation marker. However, an opposite effect was observed in mice infected with MP287/03 strain, in other words, in P2X7RKO mice there was a higher activation of both lymphocyte populations compared to C57BL/6 mice. Furthermore, pulmonary cells from P2X7RKO mice infected with Beijing 1471 strain produced less IFN- γ (proinflammatory cytokine) and more IL-10 (anti-inflammatory cytokine), in comparison with those from C57BL/6 mice. In contrast, pulmonary cells from P2X7RKO mice infected with MP287/03 strain produced more IFN- γ and less IL-10, in comparison with those from C57BL/6 mice. These results are compatible with those regarding the lymphocyte activation profile. Additionally, experiments with chimeric mice revealed that the P2X7R expression on cells that originated from the bone marrow is an important factor associated with severe TB. We concluded that despite the differences between the immunomodulatory properties induced by both hypervirulent strains, the P2X7R expressed in bone marrow-derived cells plays a deleterious role in severe TB. In addition, we showed that the absence of this receptor in both infection models of

severe TB restores the pulmonary immune response to a profile similar to the one induced by the less virulent H37Rv strain.

Keywords: Tuberculosis. Immune response. Hypervirulent mycobacteria. Tissue injury. ATP. P2X7 receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estimativa das taxas de incidência de TB em 2012.	23
Figura 2: Metabolismo do ATP e sinalização purinérgica.	30
Figura 3: Análise do número total de células presentes no pulmão dos camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	40
Figura 4: Fenotipagem de células CD11b ⁺ infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	42
Figura 5: Fenotipagem de células CD11b ⁺ Ly6G ⁺ infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	44
Figura 6: Fenotipagem de células CD11b ⁺ Ly6G ^{int} F4/80 ^{high} infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	46
Figura 7: Fenotipagem de células CD11b ⁺ Ly6G ^{int} F4/80 ^{high} infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	48
Figura 8: Fenotipagem de células CD11b ⁺ Ly6G ^{int} F4/80 ^{low} infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	50
Figura 9: Fenotipagem de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ infiltrados nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	52
Figura 10: Fenotipagem de linfócitos B (CD19 ⁺) presentes nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	53
Figura 11: Perfil de ativação de linfócitos T CD4 ⁺ presentes nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	55
Figura 12: Perfil de ativação de linfócitos T CD8 ⁺ presentes nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas.	57
Figura 13: Produção de citocinas (IFN γ e IL-10) <i>ex vivo</i> infectados com as três cepas micobacterianas.	58
Figura 14: Reconstituição das quimeras após 3 meses de transplante (análise do sangue e do pulmão).	59
Figura 15: Análise macroscópica dos pulmões de camundongos C57BL/6, P2X7RKO e quimérios (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03 ...	61

Figura 16: Análise do número total de células presentes no pulmão dos camundongos C57BL/6, P2X7RKO e quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03 e avaliação da morte celular <i>in vivo</i>	63
Figura 17: Análise do número de UFCs presentes no pulmão, baço e fígado de camundongos C57BL/6, P2X7RKO e quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03	64
Figura 18: Fenotipagem de células CD11b ⁺ infiltradas nos pulmões de camundongos quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03 .	67
Figura 19: Fenotipagem de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ presentes nos pulmões de camundongos quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03	68
Figura 20: Modelo esquemático proposto para o envolvimento do P2X7R na modulação da resposta imune pelas cepas hipervirulentas Beijing 1471 e MP287/03	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Albumina, dextrose e catalase
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CR	Receptor de complemento
DC	Célula dendrítica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
Mbv	<i>Mycobacterium bovis</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NO	Óxido Nítrico
OADC	Oleato, albumina, dextrose e catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões moleculares associado à patógeno
PBS	Salina fosfatada tamponada
P2X7	Receptor P2X7
P2X7RKO	<i>Knockout</i> do receptor P2X7
Poly IC	Ácido polinosínico-policitidílico
PPT	Tuberculose primária progressiva
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
SPF	Livre de patógenos específicos
TB	Tuberculose

T _{cm}	Linfócito T de memória central
T _e	Linfócito T efetor
T _{em}	Linfócito T de memória efetora
TCR	Receptor de Célula T
Th	Célula T auxiliar
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO:	21
1.1 Tuberculose	22
1.2 Micobactérias	24
1.3 Tuberculose severa e modelo murino	25
1.4 A resposta imune na tuberculose	26
1.5 ATP, receptor P2X7 e a resposta inflamatória	28
1.6 P2X7R e a TB	31
2 OBJETIVOS	32
2.1 Geral	33
2.2 Específicos	33
3 METODOLOGIA	34
3.1 Camundongos	35
3.2 Cultivo de micobactérias	35
3.3 Analgesia	36
3.4 Infecção dos animais	36
3.5 Crescimento bacteriano <i>in vivo</i> e análise histológica	36
3.6 Citometria	37
3.7 Produção de citocinas	37
3.8 Construção das quimeras	37
3.9 Análise Estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Avaliação da resposta imune no pulmão de animais C57BL/6 eP2X7RKO infectados com as cepas H37Rv, Beijing 1471 e MP287/03	40
4.1.1 Número total de células no pulmão	40
4.1.2 Fenotipagem do infiltrado leucocitário pulmonar derivado da linhagem mieloide	41
4.1.3 Fenotipagem do infiltrado leucocitário pulmonar derivado da linhagem linfóide	51

4.1.4 Avaliação do perfil de ativação de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no pulmão	54
4.1.5 Produção de citocinas <i>ex vivo</i> de células infiltradas no pulmão	58
4.2 Estudos da tuberculose em camundongos quiméricos de medula óssea induzida pela cepa hipervirulenta MP287/03.....	59
4.2.1 Análise da reconstituição da medula óssea das quimeras	59
4.2.2 Avaliação macroscópica do pulmão	60
4.2.3 Número total de células infiltradas no pulmão e morte celular	62
4.2.4 Número de UFCs no pulmão, baço e fígado	64
4.2.5 Fenotipagem do infiltrado leucocitário pulmonar	65
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* que acomete principalmente o sistema respiratório, podendo atingir também outros sítios extrapulmonares como o trato geniturinário, sistema nervoso central e o esqueleto (HARISINGHANI et al., 2000; SUNDARAMURTHY; PIETERS, 2007). Embora ela seja, em grande parte, uma doença curável, a TB permanece como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo.

A micobactéria emergiu como um patógeno humano na África, cerca de 70.000 anos atrás e então se espalhou por todos os continentes devido o processo de migração do homem (DELOGU; SALI; FADDA; GUTIERREZ et al., 2005). Atualmente, estima-se que 2 bilhões de pessoas estão infectadas com a *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) no mundo mas permanecem assintomáticas, quadro clínico definido como TB latente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Destes indivíduos infectados, cerca de 5-10% deverão desenvolver a doença ativa no decorrer da vida. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 houve aproximadamente 8,6 milhões de novos casos de TB no mundo (fig. 1) e 940 mil pessoas morreram em decorrência dessa doença, sendo uma das principais causas de morte por agentes infecciosos (WHO, 2013).

O Brasil ocupa o 16º lugar entre os 22 países priorizados pela OMS, que representam 80% da carga mundial de TB (BRASIL, 2014). Em 2013, foram notificados 71.123 casos novos no país, correspondendo a um coeficiente de incidência de 35,4/100.000 habitantes. Em 2008 a TB foi a 4ª causa de morte por doenças infecciosas e a 1ª causa de morte dos pacientes com AIDS (BRASIL, 2010).

Figura 1: Estimativa das taxas de incidência de TB em 2012.

Fonte: WHO, 2013

Vários fatores colaboram para as elevadas taxas da doença, como por exemplo, o surgimento de micobactérias resistentes a múltiplas drogas, a carência de diagnóstico rápido e a alta incidência de pacientes portadores de AIDS (YOUNG et al., 2008). A vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin), apesar do amplo uso em recém nascidos, não previne a doença pulmonar em adultos de forma satisfatória e, portanto, não reduz a carga global de tuberculose (KAUFMANN; HUSSEY; LAMBERT, 2010).

Alguns estudos demonstram que a redução da eficácia da BCG e/ou aumento da susceptibilidade de jovens adultos à TB estão relacionadas à vários eventos. A co-infecção com helmintos, por exemplo, promove um desvio do mecanismo imunológico induzindo as respostas Th2 e de células T regulatórias, as quais diminuem a eficácia da proteção dependente de respostas Th1 (ELIAS et al., 2008). Vírus que comprometem a defesa do hospedeiro, como o HIV, também contribuem para a redução da eficácia da vacina (OTTENHOFF; KAUFMANN, 2012).

O desenvolvimento da doença tuberculose resulta a partir da interação entre o ambiente, o hospedeiro e o patógeno, além de alguns fatores de riscos conhecidos como co-infecção com HIV, imunodeficiências, diabetes mellitus, má nutrição e pobreza em geral (O'GARRA et al., 2013).

1.2 Micobactérias

O gênero *Mycobacterium* atualmente consiste em 128 espécies validamente publicadas e pelo menos 34 espécies não totalmente descritas ou nomeadas (BOTHÁ; VAN PITTIUS; VAN HELDEN, 2013; VAN HELDEN; PARSONS; GEY VAN PITTIUS, 2009). Essas bactérias compreendem principalmente saprófitos que vivem no solo, e apenas poucas espécies possuem o estilo de vida patogênico, sendo algumas patogênicas obrigatórias e outras oportunistas (COSMA; SHERMAN; RAMAKRISHNAN, 2003).

Robert Koch foi o primeiro cientista a descrever a Mtb como a causa da tuberculose em 1882. Embora não hajam pesquisas completas e detalhadas sobre prevalência, alguns trabalhos mostram que essa espécie ainda é o principal agente causador da tuberculose em humanos (AGUILAR LEON et al., 2009). Essa doença é transmitida principalmente por via aérea, a partir da inalação de gotículas contendo as micobactérias expelidas pela tosse, fala ou espirro de doente com tuberculose ativa das vias respiratórias (pulmonar ou laríngea). Os sintomas clássicos da tuberculose pulmonar são: tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento.

A *Mycobacterium bovis* (Mbv), agente causador da tuberculose bovina, infecta principalmente animais de importância agropecuária, como o gado, mas também vários mamíferos selvagens, como veado (*Cervus elaphus*), gambá (*Trichosurus vulpecul*) e texugo (*Meles meles*), além de induzir tuberculose em humanos. Essa grande variedade de hospedeiros torna a tuberculose bovina difícil de ser erradicada em todo o mundo. Somente no setor pecuário, um prejuízo estimado em 3 bilhões de dólares é causado por esse bacilo anualmente (GARNIER et al., 2003; MEIKLE et al., 2011; WANG et al., 2013).

A transmissão zoonótica da Mbv ocorre principalmente através do contato próximo com o gado infectado ou consumo de produtos derivados de animais contaminados, como o leite não pasteurizado (MULLER et al., 2013). Os sintomas produzidos em humanos infectados com esse bacilo são clinicamente indistinguíveis dos induzidos por Mtb (OKAFOR et al., 2011).

1.3 Tuberculose severa e modelo murino

As formas agressivas da tuberculose são caracterizadas pela expansão rápida do infiltrado granulomatoso primário no pulmão, que acarreta na pneumonia tuberculosa e disseminação da bactéria para outros tecidos. Uma das principais características da TB severa é a formação de lesões necróticas caseosas com infecção bacilar extracelular e fragmentos de células, o que facilita a disseminação da micobactéria (DORHOI; REECE; KAUFMANN, 2011).

Os modelos murinos são extremamente usados na caracterização de mecanismos que estão envolvidos na patogênese e na geração da imunidade protetora na TB. Entretanto, é difícil estudar fatores relacionados com a necrose pulmonar porque este processo é atípico em camundongos que são infectados com cepas virulentas de Mtb, como a cepa referência H37Rv (DORHOI et al., 2011). As lesões necróticas ocorrem normalmente em camundongos deficientes em moléculas imunologicamente relevantes como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), receptor de células T (TCR) $\alpha\beta$, IFN- γ , receptor de TNF entre outras (GIL et al., 2006).

Alternativamente, condições artificiais são frequentemente utilizadas para induzir a necrose em camundongos, como infecção intraperitoneal com doses extremamente altas do bacilo ou infecção intranasal com baixa carga bacilar seguido pela aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) ou ácido polinosínico-policidílico (Poly IC) (ANTONELLI et al., 2010; CARDONA et al., 2001). No entanto, estudos recentes têm mostrado que cepas de Mtb pertencentes à família do genótipo Beijing, as quais são associadas com alta virulência, transmissibilidade e resistência a múltiplas drogas, estão mais relacionadas com a progressão rápida da infecção primária à TB ativa do que cepas pertencentes a outros grupos (HANEKOM et al., 2011; THWAITES et al., 2008). Essas cepas de alta virulência do genótipo Beijing promovem uma doença rapidamente fatal em camundongos, que é caracterizada por uma patologia pulmonar severa, com alta carga bacteriana e extensiva área de necrose pulmonar (AGUILAR et al., 2010). Além do mais, a infecção de camundongos com baixas doses de cepas de Mtb também é capaz de causar pneumonia repentina com extensa necrose que leva à morte prematura (AGUILAR LEON et al., 2009; AMARAL et al., 2014). Portanto, os modelos de infecção, utilizando isolados clínicos hipervirulentos, possuem características de progressão

da patologia semelhantes às observadas no desenvolvimento da tuberculose primária progressiva (PPT do inglês *progressive primary tuberculosis*) em humanos.

1.4 A resposta imune na tuberculose

Após o indivíduo inalar o aerossol contendo as micobactérias, os bacilos atingem os alvéolos pulmonares, onde eles então são fagocitados por vários tipos celulares incluindo macrófagos alveolares, macrófagos intersticiais e células dendríticas (DC) (OTTENHOFF; KAUFMANN, 2012).

Essas células do sistema imune inato identificam o micro-organismo invasor por proteínas que reconhecem padrões moleculares conservados nos patógenos. Uma importante classe desses receptores de reconhecimento de padrões (PRR) evolutivamente conservado são os receptores semelhantes ao Toll (TLR) (KRUTZIK; MODLIN, 2004; RYFFEL et al., 2005; SUNDARAMURTHY; PIETERS, 2007). Onze diferentes classes de TLR foram identificadas em humanos e são capazes de reconhecer diferentes classes de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP). O reconhecimento da micobactéria é mediado pelo TLR 2, que atua como um heterodímero com os TLRs 1 e 6, e pelo TLR 4 (Krutzik e Modlin, 2004; Ryffel et al., 2005). Outros receptores que também estão envolvidos no reconhecimento do bacilo e medeiam o processo de fagocitose são os receptores de manose, receptores *scavenger*, CD14, receptor de lectina tipo-C, Dectina-1, receptores de complemento CR1, CR2 e CR4 (KRUTZIK; MODLIN, 2004; RYFFEL et al., 2005; SUNDARAMURTHY; PIETERS, 2007).

Após serem reconhecidas e fagocitadas pelos macrófagos, as micobactérias patogênicas interferem com as vias de tráfico intracelular da célula hospedeira, modulando o processo de maturação do endossomo/fagossomo através da resistência ao endereçamento lisossomal (MAJLESSI et al., 2007). A retenção dentro do fagossomo micobacteriano não lisossomal se torna um microambiente ideal para o desenvolvimento do bacilo, colaborando para sua proliferação (CLEMENS; HORWITZ, 1995; HOUBEN; NGUYEN; PIETERS, 2006). As principais características desse fagossomo incluem a escassez da H⁺ ATPase vesicular, que resulta na ineficiente acidificação luminal, e níveis inadequados de hidrolases lisossomais maduras (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994; VERGNE et al., 2005).

Apesar da inibição da fusão fagossomo-lisossomo, a apresentação de antígenos micobacteriano via MHC-I ou MHC-II não é afetada (MAJLESSI et al., 2007).

As micobactérias também conseguem estabilizar a infecção enquanto atrasam o início da resposta imune adaptativa por 2-3 semanas. Essa estratégia permite ao bacilo estabelecer a infecção e alcançar uma massa crítica de micro-organismo infectante, a partir da qual dois tipos de populações podem ser derivadas: 1) bacilos “dormentes” ou “não replicantes”, os quais permanecem em estado de baixa atividade metabólica (estado de latência) nas células hospedeiras (URDAHL; SHAFIANI; ERNST, 2011). Esses bacilos dormentes apresentam-se como um potencial reservatório de bactérias que podem retomar suas funções ativas em um período mais tardiamente da vida e só então causar a doença. 2) bactérias ativas metabolicamente que estimulam a resposta imune no hospedeiro, a qual pode conferir proteção mas quando inadequada permite o desenvolvimento da tuberculose ativa (OTTENHOFF; KAUFMANN, 2012; URDAHL et al., 2011).

Apesar do atraso do início da resposta imune adaptativa, as DCs são as primeiras a apresentarem antígeno aos linfócitos T após migrarem para o linfonodo drenante do pulmão (linfonodo mediastinal), 8-12 dias depois da infecção (STEINMAN, 2012). As células T CD4⁺ específicas para os antígenos micobacterianos são estimuladas e diferenciadas em Th1, que ativam os macrófagos através da produção de IFN- γ , promovendo uma resposta granulomatosa, além de aumentar a resposta microbida dos macrófagos (O'GARRA et al., 2013; ORME et al., 1992).

Linfócitos T CD8⁺ também contribuem para a imunidade antimicobacteriana, secretando IFN- γ para ativação de macrófagos e/ou secretando componentes que podem matar diretamente a célula infectada (NORTH; JUNG, 2004). A subpopulação de linfócitos Th17 também executa um papel importante na resposta imune contra micobactérias através da secreção de IL-17, a qual induz a produção de quimiocinas como CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que por sua vez promovem o recrutamento de células secretoras de IFN- γ , reduzindo o crescimento bacteriano (KHADER et al., 2007).

Com a finalidade de conter a proliferação bacteriana ocorre a formação do granuloma, uma estrutura altamente organizada formada por agregados de células imunes em resposta à estímulos persistentes (RAMAKRISHNAN, 2012). O processo

de iniciação da formação do granuloma ocorre rapidamente após a infecção. Segue então uma cascata de eventos envolvendo a produção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, e quimiocinas que irão levar ao recrutamento adicional de células imunes para o local da infecção. Esse acúmulo de células migrantes em torno do foco das células infectadas leva a formação de uma estrutura rica em macrófagos conhecida granuloma.

1.5 ATP, receptor P2X7 e a resposta inflamatória

A Inflamação acompanha um mecanismo homeostático complexo que habilita o organismo a detectar e combater os antígenos não próprios e restaurar a integridade do tecido (JACOB et al., 2013). Os mediadores inflamatórios são geralmente responsáveis por iniciar a resposta imune, porém algumas moléculas constitutivas do meio intracelular do hospedeiro, que estão envolvidas na manutenção fisiológica normal da célula, também podem ser liberadas para o meio extracelular e regular a função das células imunes, participando e/ou modulando a resposta inflamatória sob condições patológicas (JACOB et al., 2013; JUNGER, 2011; LOTZE et al., 2007; RUBARTELLI; LOTZE, 2007). O ATP celular, por exemplo, serve como uma fonte de energia para quase todas as funções celulares, mas também pode ser liberado por células ativadas e modular a resposta imune (JUNGER, 2011).

Quando ativadas, as células do sistema imune podem liberar o ATP para o espaço extracelular através de um transporte regulado, mediado pelos canais conexina e panexina. No entanto, o ATP também pode ser liberado passivamente seguido pelo estresse celular ou morte celular necrótica, processo em que há ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular (fig. 3) (BODIN; BURNSTOCK, 2001; JACOB et al., 2013; JUNGER, 2011; PRAETORIUS; LEIPZIGER, 2009). Esse nucleotídeo, presente no meio extracelular, atua mediante a ativação dos receptores purinérgicos da família P2. Os receptores P2, por sua vez, são classificados em duas subfamílias: P2Y que são receptores acoplados a proteína G; e P2X que são canais iônicos ativados por ligantes. Até o presente momento, são conhecidas oito subunidades da família P2Y

(P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14) e sete da P2X (P2X1 – P2X7) (ABBACCHIO et al., 2009; BURNSTOCK, 2007; MILLER et al., 2011).

Os receptores P2X funcionam como canais iônicos não seletivos permeáveis ao Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Quando ativados, esses receptores causam um aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} e Na^+ e diminuição de K^+ que resulta na despolarização da membrana celular e ativação das vias de sinalização dependente de cálcio (KHAKH; NORTH, 2006; MILLER et al., 2011; SKAPER; DEBETTO; GIUSTI, 2010; YOUNG, M. T., 2010).

O receptor P2X7 (P2X7R) é expresso em diversas células do sistema imune, tais como macrófagos, mastócitos, eosinófilos, DCs, linfócitos e neutrófilos (JACOB et al., 2013). Ele está envolvido em vários processos, como morte celular e estímulos de ativação e proliferação de células (ADINOLFI et al., 2005). Concentrações reduzidas de ATP promovem baixa ativação do P2X7R, que induz ativação celular e proliferação. Em contrapartida, estímulos do P2X7R com altas concentrações de ATP leva à formação de poros na membrana e à morte celular, que pode ser por necrose ou apoptose, dependendo do tempo de exposição e do tipo celular (ADINOLFI et al., 2005; DI VIRGILIO et al., 1998). Quando estimulado o P2X7R também induz a ativação do inflamossoma, que causa a clivagem da pró IL-1 β em IL-1 β (forma ativa da citocina) (JACOB et al., 2013). Master (2008) havia mostrado que Mtb inibia a ativação do inflamossoma e consequentemente a produção de IL-1 β . Entretanto, nós mostramos recentemente que diferentes cepas micobacterianas possuem distintas propriedades modulatórias e que a cepa Beijing 1471 de Mtb induz altos níveis de produção de IL-1 β (AMARAL et al., 2014; SS et al., 2008).

Como já mencionado anteriormente, a Mtb sobrevive e prolifera no interior do macrófago por conseguir inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo. Lammas *et al* (1997) mostraram que o tratamento com ATP de macrófagos infectados com BCG causava uma redução na viabilidade intracelular da micobactéria. Mais tarde, em 2001, Fairbairn e colaboradores revelaram que a ativação do P2X7R com ATP em macrófagos infectados com BCG torna-os capazes de induzir a morte da micobactéria por conseguir superar a inibição da fusão fagossomo-lisossomo, promovida pelo bacilo, através do estímulo via fosfolipase D (FAIRBAIRN et al., 2001; LAMMAS et al., 1997). Smith também mostrou que o tratamento com ATP de

macrófagos infectados com BCG é responsável por reduzir a viabilidade da célula hospedeira bem como da bactéria, indicando uma possível indução de apoptose (SMITH; ALVAREZ; ESTES, 2001).

Trabalhos recentes também têm mostrado que linfócitos T podem liberar ATP em resposta a vários estímulos extracelulares, revelando que este nucleotídeo possui um papel importante na ativação dessas células. O estímulo do TCR induz a abertura dos canais de panexina e liberação do ATP na sinapse imunológica, onde esta molécula irá contribuir para ativação dos linfócitos via ativação dos receptores P2X1, P2X4 e P2X7 (FILIPPINI; TAFFS; SITKOVSKY, 1990; JUNGER, 2011; SCHENK et al., 2008; YIP et al., 2009).

Quando presente no espaço extracelular, o ATP é rapidamente hidrolisado de forma gradual à ADP, AMP e adenosina por ectonucleotidasas (YEGUTKIN, 2008). Esse processo reduz a ativação dos receptores P2 promovido pelo ATP, prevenindo a sua dessensibilização (fig. 2) (JUNGER, 2011). A adenosina produzida pelo metabolismo de ATP pode se ligar aos receptores P1, pode ser degradada pelas enzimas adenosina deaminase e também pode ser recapturada para o interior da célula através dos Transportadores de Concentração de Nucleotídeos (CNTs) (BALDWIN et al., 2004; GRAY; OWEN; GIACOMINI, 2004).

Figura 2: Metabolismo do ATP e sinalização purinérgica.
Fonte: Junger 2011

Os receptores de adenosina P1 são subdivididos em A1, A2 e A3. Os receptores A2 têm um papel importante na supressão da resposta imune. Dessa forma, a complexa rede de ectonucleotidases que regulam os ligantes dos receptores P1 e P2 em diferentes tecidos são extremamente importantes para definir a resposta imune em um determinado órgão (BOURS et al., 2006; JUNGER, 2011; YEGUTKIN, 2008).

1.6 P2X7R e a TB

Nós havíamos mostrado recentemente que as cepas hipervirulentas Beijing 1471 de Mtb e MP287/03 de Mbv induziam extensa inflamação e necrose pulmonar em camundongos, além de promover uma maior disseminação bacilar e morte precoce dos animais (AMARAL et al., 2014). Hipotetizamos então que a resposta imune inata à sinais de dano, como por exemplo o ATP, a partir de células necróticas poderia agravar a doença. De fato, foi observado que os camundongos deficientes da expressão do P2X7R (P2X7RKO) apresentaram uma doença mais branda, com considerável redução da disseminação bacilar e inflamação pulmonar sem evidências de lesões necróticas (AMARAL et al., 2014).

Tendo visto que os animais P2X7RKO tinham uma doença mais amena em relação aos camundongos C57BL/6, decidimos então estudar o perfil de resposta imune induzido pelas cepas hipervirulentas Beijing 1471 e MP287/03 em ambas linhagens de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO, e verificar se a maior resistência dos animais P2X7RKO está associada a alterações na resposta imune pulmonar.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a participação do P2X7R na resposta imune induzida pelas micobactérias hipervirulentas Beijing 1471 e MP287/03, utilizando a cepa H37Rv como referência de cepa padrão de virulência.

2.2 Específicos

- Estudar o perfil fenotípico do infiltrado leucocitário no pulmão de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas (Beijing 1471, MP287/03 e H37Rv)
- Identificar se o P2X7R interfere com a ativação de linfócitos T nos animais infectados com as três cepas
- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas
- Verificar se a expressão do P2X7R nas células derivadas da medula óssea é o fator responsável pela maior susceptibilidade ao desenvolvimento da tuberculose severa induzida pela cepa de maior virulência MP287/03 utilizando um modelo quimérico

3 METODOLOGIA

3.1 Camundongos

Os camundongos utilizados para execução do projeto (C57BL/6, CD45.1 e P2X7RKO) são livres de patógenos específicos (SPF) e foram fornecidos pelos biotérios de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo.

Os animais foram infectados e mantidos em microisoladores (racks ventiladas) no biotério de biossegurança nível 3 (NB-3) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP, coordenado pelo Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata. Este projeto utilizando o modelo animal de camundongos foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do instituto de Ciências Biomédicas (protocolo 153/11) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (protocolo 444) da Universidade de São Paulo.

3.2 Cultivo de micobactérias

A cepa de Mtb H37Rv, usada como referência, foi gentilmente cedida pelo Dr. Philip Stuffys da FioCruz do Rio de Janeiro. A cepa de Mbv MP287/03, foi cedida pelo Dr. José Soares Ferreira Neto da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, e o isolado clínico *Beijing* 1471 foi obtido de um paciente do hospital especializado em tuberculose no nordeste da Rússia (St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology) (LASUNSKAIA et al., 2010).

Os bacilos cresceram em meio sólido Middlebrook 7H10 (Ágar) suplementado com meio de enriquecimento OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase – Difco Laboratories) à temperatura de 37°C por 21 dias. Após crescidas, essas colônias foram removidas do Ágar e ressuspensas em meio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), acrescido de 0,05% Tween 80 e suplementado com ADC (albumina, dextrose e catalase – Becton Dickinson) até atingirem a fase mid-log no 7º dia com constante agitação.

3.3 Analgesia

Os camundongos foram anestesiados antes do procedimento experimental com uma injeção de 120 μ L, via intraperitoneal (i.p.), de uma solução contendo Anazedan – xilazina (15 mg/Kg – Vetbrands) e Dopalen – Ketamina (110 mg/Kg – Vetbrands). Após cerca de 3 minutos da aplicação da anestesia, foram feitos testes de reflexos, para certificar que os animais realmente estavam anestesiados.

3.4 Infecção dos animais

Para realização dos experimentos, os bacilos foram removidos do freezer, descongelados e adicionados em meio Middlebrook 7H9 com 10% de ADC. Para dispersão dos grumos de bactérias, foi realizado um processo de sonicação em banho ultrassônico da cultura em suspensão e em seguida agitado em vórtex por 1 minuto (FATTORINI et al., 2002). A quantificação de bacilos foi realizada por um espectrofotômetro (Hitachi-model U-1100) com comprimento de onda de 600 nm.

O procedimento cirúrgico de infecção foi realizado via intratraqueal inoculando 60 μ L com aproximadamente 100 bactérias. Como controle foram usados animais inoculados com salina.

3.5 Crescimento bacteriano *in vivo* e análise histológica

Os grupos de animais infectados foram eutanasiados no 28º dia após a infecção através de deslocamento cervical. Em seguida foram coletados os pulmões, baço e fígado de cada camundongo. Para obtenção das bactérias presentes no pulmão, o lóbulo superior esquerdo foi removido e colocado em duas mL de meio RPMI-incompleto (Gibco) e pesado usando uma balança analítica. Com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgica, o lóbulo foi macerado, e então se acrescentou duas mL de solução de digestão [1 mg/mL de Colagenase tipo IV (Sigma, USA)] e incubado por 40 minutos sob agitação de 160 rpm. Posteriormente, essa solução com o lóbulo macerado foi submetido à passagem pela seringa de 10 mL para melhor dissociação do tecido e dispersão das células. A amostra obtida foi filtrada em *cell strainer* e uma

alíquota de 100 µL foi utilizada para realizar diluições seriadas e em seguida semear em meio Ágar Middlebrook 7H10 suplementado com OADC. O restante da amostra foi mantido em gelo para posterior marcação das células e análise em citometria de fluxo. As placas foram vedadas e incubadas em estufa com 0,5% de CO₂ e 37°C por aproximadamente 24 dias, quando então realizamos a quantificação de unidades formadoras de colônias (UFCs). Os demais lóbulos do pulmão foram fixados em formol tamponado 10% para posterior análise histológica.

3.6 Citometria

As células obtidas do processamento do pulmão foram mantidas em gelo e uma alíquota foi tratada com 0,1% de azida sódica por 10 minutos para quantificação. Foram plaqueadas 8×10^5 células/poço e em seguida foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD11b, anti-F4/80, anti-Ly6G, anti-Ly6C, anti-CD11c, anti-MHC-II, anti-CD80, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD44, anti-CD69 e anti-CD62L. Os anticorpos eram marcados com *Pacific Blue* (PB), *Peridinin Chlorophyll Protein Complex* (PerCP), *Allophycocyanin* (APC), *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) e *phycoerythrin* (PE), APC/Cy7, PE/Cy7.

3.7 Produção de citocinas

As células infiltradas no pulmão foram suspensas em meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de SBF, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato e 0,1 % de gentamicina) e cultivados em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço numa estufa com 5 % de CO₂ à 37°C por 48 horas. Após esse período o sobrenadante da cultura foi recolhido, filtrado e estocado à -80°C. Os níveis de IL-10 e IFN-γ foram quantificados usando o sistema bioplex.

3.8 Construção das quimeras

Camundongos C57BL/6 CD45.1 foram irradiados com dose letal (~1200 rads) e em seguida transplantados com $\sim 2 \cdot 10^7$ de células da medula óssea proveniente de animais C57BL/6 (C57BL/6>C57BL/6) ou P2X7RKO (P2X7RKO>C57BL/6). Após

o transplante os animais foram tratados com antibiótico por 30 dias. Esperou-se mais 60 dias para que houvesse a repopulação dos leucócitos. Percorrido os 90 dias depois da irradiação, os animais foram infectados de acordo com o descrito no tópico 3.04.

3.9 Análise Estatística

O programa estatístico utilizado para análise dos dados e produção dos gráficos foi o Prisma versão 5.1 (GraphPad Software Incorporated, EUA). As análises foram feitas usando o teste ANOVA e/ou teste T de student, e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Estudos prévios já haviam mostrado o envolvimento do P2X7R em doenças infecciosas, e que a ausência desse receptor altera a função das células imunes (MILLER et al., 2011). O ATP extracelular (ATPe), ligante do P2X7R, é um sinal de dano que está envolvido no reconhecimento e controle de diversos patógenos intracelulares (COUTINHO-SILVA; OJCIUS, 2012). Recentemente nós também mostramos que camundongos P2X7RKO são mais resistentes ao desenvolvimento da TB induzida por cepas hipervirulentas do que os C57BL/6 (Amaral et al, 2014). Partindo desse pressuposto, nós inicialmente nos perguntamos se a maior resistência dos camundongos P2X7RKO às bactérias hipervirulentas estaria associada a variações na resposta imune pulmonar.

4.1 Avaliação da resposta imune no pulmão de animais C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as cepas H37Rv, Beijing 1471 e MP287/03

4.1.1 Número total de células no pulmão

Pode ser notado que houve um aumento do número total de células presentes no pulmão dos camundongos C57BL/6 infectados com as três cepas (H37Rv, Beijing 1471 e MP287/03) em relação ao controle (fig. 3). Entretanto, apenas os camundongos P2X7RKO infectados com as estirpes hipervirulentas Beijing 1471 e MP287/03 apresentaram menor quantidade de células no pulmão do que os C57BL/6 (fig. 3).

Figura 3: Análise do número total de células presentes no pulmão dos camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterinas. Os pulmões dos camundongos foram removidos no 28º dia de infecção e em seguida processados para contagem do número total de células. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. Todos os animais infectados apresentaram diferença significativa em relação aos controles ($p < 0,05$). As barras com o símbolo * em cima mostram apenas as diferenças significativas entre os animais C57BL/6 e P2X7RKO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

4.1.2 Fenotipagem do infiltrado leucocitário pulmonar derivado da linhagem mieloide

Tendo visto que o número de células no pulmão estava aumentado nos animais C57BL/6 infectados com as cepas hipervirulentas (Beijing 1471 e MP287/03) em relação aos P2X7RKO, decidimos avaliar em seguida o perfil fenotípico do infiltrado leucocitário pulmonar de ambas linhagens de camundongos.

Na análise das células pulmonares primeiramente retiramos os *dublets* (células grudadas), e em seguida selecionamos apenas as populações com tamanho compatível com células viáveis (fig. 4A). Posteriormente, a expressão de F4/80 e CD11b nestas populações foi avaliada. Nessa janela pode-se notar a presença de quatro populações distintas: uma CD11b⁻ e três populações CD11b⁺. A população CD11b⁺ subdivide-se em CD11b⁺F4/80^{high} (F4/80^{hi}), CD11b⁺F4/80^{low} (F4/80^{low}) e CD11b⁺F4/80⁻. Somente as células CD11b⁺ foram selecionadas e então avaliadas quanto à expressão de Ly6G (fig. 4A). Pode-se notar que o grupo de células CD11b⁺F4/80⁻ foi a população que apresentou alta expressão de Ly6G (característico de neutrófilo), portanto chamaremos essa população CD11b⁺F4/80⁻ de Ly6G⁺.

Ao comparar a frequência de células CD11b⁺ entre os camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as cepas H37Rv e Beijing 1471 observamos valores percentuais semelhantes em ambos animais (fig. 4B). No entanto, os animais C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 apresentaram uma população completamente diferente da observada nos P2X7RKO infectados com essa mesma cepa. Além do mais, a população observada nos animais P2X7RKO foi semelhante às nos demais grupos infectados (fig. 4B).

Apesar de não ter sido observada diferença na frequência de células CD11b⁺ nos camundongos infectados com a estirpe Beijing 1471, notou-se que houve uma menor quantidade de células CD11b⁺ nos camundongos P2X7RKO em relação aos C57BL/6 (fig. 4C). Também foi constatada uma menor quantidade dessa população de células nos camundongos P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 do que nos C57BL/6 infectados com a mesma cepa.

Figura 4: Fenotipagem de células CD11b⁺ infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. No 28^o dia de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas e marcadas com os anticorpos anti-CD11b, anti-F4/80 e anti-Ly6G. (A) Estratégia de *gates* utilizada na análise. (B) Frequência de células CD11b⁺ nos camundongos C57BL/6 e P2X7RKO. (C) Número total de células CD11b⁺. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

Posteriormente, avaliamos a expressão de Ly6G no grupo de células CD11b⁺ nas linhagens C57BL/6 e P2X7RKO. Novamente não observamos grandes diferenças em relação à frequência, exceto nos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 que apresentaram uma população completamente distinta daquelas observadas nos demais animais (fig. 5A), a qual será discutida posteriormente. Entretanto, quando observamos a quantidade total de células Ly6G⁺ podemos notar que houve uma menor quantidade nos animais P2X7RKO infectados com a estirpe Beijing 1471 em relação aos animais C57BL/6 infectados com a mesma cepa (fig. 5C). Devido à população de células dos animais C57BL/6 infectados com a bactéria MP287/03 se apresentar de forma diferente, a qual não se enquadra nos *gates* utilizados, optamos por não quantificar o número de células Ly6G⁺.

Figura 5: Fenotipagem de células CD11b⁺Ly6G⁺ infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. No 28^o dia de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas e marcadas com os anticorpos anti-CD11b, anti-F4/80, anti-Ly6G e anti-CD11c. As células foram selecionadas a partir da população CD11b⁺Ly6G⁺ (denominada Ly6G⁺). (A) Frequência de células Ly6G⁺. (B) Número absoluto de células Ly6G⁺. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

Em seguida, optamos por avaliar a expressão de CD11c na população F4/80^{hi} (CD11b⁺F4/80^{hi}). Percebe-se que há duas populações distintas: F4/80^{hi}CD11c⁺ (característico de macrófagos alveolares) e F4/80^{hi}CD11c⁻ (característico de macrófagos intersticiais). A frequência de ambas populações entre os animais C57BL/6 e P2X7RKO foram semelhantes, exceto nos animais C57BL/6 infectados com a estirpe MP287/03 que novamente apresentaram uma população distinta da observada nos demais camundongos (fig. 6A). Devido à discrepância desta população, optamos por fazer um *gate* diferenciado para sua análise (fig. 6A). Como a população observada nos animais P2X7RKO infectados com essa mesma cepa, MP287/03, apresentava característica semelhantes aos demais animais, utilizamos a mesma estratégia de *gates* usada nas outras infecções e nos controles (fig. 6A).

Em relação ao número absoluto de células, foi notado que os camundongos P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 apresentaram menor quantidade de células F4/80^{hi}, F4/80^{hi}CD11c⁺ e F4/80^{hi}CD11c⁻ (fig. 6B). Nenhuma diferença quantitativa foi observada nos camundongos infectados com a cepa H37Rv (fig. 6B). Como não foi possível identificar as três populações F4/80^{hi}, F4/80^{hi}CD11c⁺ e F4/80^{hi}CD11c⁻ nos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03, não quantificamos o número absoluto dessas células nesses animais.

Figura 6: Fenotipagem de células CD11b⁺Ly6G^{int}F4/80^{high} infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. No 28^o dia de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas e marcadas com os anticorpos anti-CD11b, anti-F4/80, anti-Ly6G e anti-CD11c. As células foram selecionadas a partir da população CD11b⁺Ly6G^{int}F4/80^{high} (F4/80^{hi}). (A) Expressão de CD11c das células F4/80^{hi}. (B) Número de células F4/80^{hi}, F4/80^{hi}CD11c⁺ e F4/80^{hi}CD11c⁻. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

Tendo visto que a população $F4/80^{hi}$ formava duas subpopulações ($F4/80^{hi}CD11c^+$ e $F4/80^{hi}CD11c^-$) decidimos avaliar a expressão de MHC-II e CD80, também conhecido como B7-1, em ambas populações (fig. 7A). Escolhemos inicialmente o animal C57BL/6 infectado com a cepa H37Rv, para fazer esta análise, porque a expressão de MHC-II e CD80 nos animais controles não infectados é baixa. Pode ser notado que as duas populações apresentaram alta expressão de MHCII e que apenas o grupo de células $F4/80^{hi}CD11c^+$ expressou CD80 (fig. 7A).

Em consequência de apenas a população duplo positiva $F4/80^{hi}CD11c^+$ expressar ambos marcadores MHC-II e CD80, escolhemos essa população para fazermos uma análise comparativa da expressão desses marcadores entre os camundongos controles e infectados com as cepas H37Rv e Beijing 1471 (fig. 7B). Pode ser notado que houve um aumento na expressão de MHC-II nas células $F4/80^{hi}CD11c^+$ de ambas linhagens de camundongos C57BL/6 e P2XRKO infectados em relação aos controles (fig. 7B). Não foi observado diferença na expressão de MHC-II entre os camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com a mesma cepa.

Ao analisarmos a expressão de CD80, notamos que não havia diferença na expressão desse marcador em ambas linhagens de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados em relação aos controles (fig. 7B). Também não foi observada diferença na expressão de CD80 entre os camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as mesmas cepas (fig. 7B).

Apesar da população visualizada nos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 ser distinta da observada nos demais animais, decidimos avaliar se ela também expressava os marcadores MHC-II e CD80. Posteriormente, fizemos uma análise comparativa com o observado nos animais P2X7RKO infectados com essa mesma cepa (fig. 7C). Nota-se que a população dos camundongos C57BL/6 infectados com a micobactéria MP287/03 não expressa MHC-II e CD80, enquanto que os animais P2X7RKO infectados com essa mesma cepa expressaram ambos marcadores (fig. 7C).

Figura 7: Fenotipagem de células CD11b⁺Ly6G^{int}F4/80^{high} infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. No 28º dia de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas e marcadas com os anticorpos anti-CD11b, anti-F4/80, anti-Ly6G, anti-CD11c, anti-Ly6C, anti-MHC-II e anti-CD80. As células foram selecionadas a partir da população CD11b⁺Ly6G^{int}F4/80^{high} (F4/80^{hi}). (A) Expressão de MHC-II e CD80 de ambas populações F4/80^{hi}CD11c⁺ e F4/80^{hi}CD11c⁻ de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa H37Rv. (B) Expressão de MHC-II e CD80 na população F4/80^{hi}CD11c⁺ de camundongos não infectados (CTRL) e infectados com as cepas H37Rv e Beijing 1471 (1471). (C) Expressão de MHC-II e CD80 da população F4/80^{hi}CD11c⁺ de camundongos P2X7RKO e da única população observada nos animais C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03.

Também avaliamos a expressão dos marcadores Ly6C e CD11c na população F4/80^{low} (fig. 8A). Pôde ser notado que em ambos os grupos de animais controles C57BL/6 e P2X7RKO haviam apenas três populações: F4/80^{low}CD11c⁻Ly6C⁻, F4/80^{low}CD11c⁺Ly6C⁻ (característico de DC) e F4/80^{low}CD11c⁻Ly6C⁺ (característico de monócitos inflamatórios). Entretanto, em todos os animais infectados, exceto nos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03, surge uma quarta população (F4/80^{low}CD11⁺Ly6C⁺) como observado na figura 8A.

Devido à distinção da população dos animais C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03, optamos novamente por fazer um *gate* diferenciado para sua análise (fig. 8A). Como a população observada nos animais P2X7RKO infectados com essa mesma cepa, MP287/03, apresentava características semelhantes aos demais animais, utilizamos a mesma estratégia de *gates* usada nas outras infecções e nos controles (fig. 8A).

Foi constatado que as frequências das populações entre os camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com a mesma cepa (H37Rv ou Beijing 1471) eram semelhantes (fig. 8A). No entanto, nos grupos infectados com a cepa Beijing 1471, notamos que houve menor quantidade no número absoluto de células F4/80^{low}, F4/80^{low}CD11c⁻Ly6C⁺ e F4/80^{low}CD11c⁺Ly6C⁺ nos camundongos P2X7RKO em relação aos animais C57BL/6 (fig. 8B). Não foi observada nenhuma diferença significativa nas populações F4/80^{low}CD11c⁻Ly6C⁻ e F4/80^{low}CD11c⁺Ly6C⁻. Como não foi possível identificar as quatro populações, F4/80^{low}CD11c⁺Ly6C⁻, F4/80^{low}CD11c⁻Ly6C⁺, F4/80^{low}CD11c⁺Ly6C⁺ e F4/80^{low}CD11c⁻Ly6C⁻ nos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03, não quantificamos o número absoluto dessas células nesses animais.

Figura 8: Fenotipagem de células CD11b⁺Ly6G⁺F4/80^{low} infiltradas nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. No 28º dia de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas e marcadas com os anticorpos anti-CD11b, anti-F4/80, anti-Ly6G, anti-CD11c e anti-Ly6C. As células foram selecionadas a partir da população CD11b⁺Ly6G⁺F4/80^{low} (F4/80^{low}). (A) Expressão de CD11c e Ly6C nas células F4/80^{low}. (B) Número de células F4/80^{low}, F4/80^{low}CD11c⁻Ly6C⁻, F4/80^{low}CD11c⁺Ly6C⁻, F4/80^{low}CD11c⁺Ly6C⁺ e F4/80^{low}CD11c⁻Ly6C⁺. Os dados são expressos como média ± erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 . n = 6.

4.1.3 Fenotipagem do infiltrado leucocitário pulmonar derivado da linhagem linfoide

Decidimos também estudar a resposta imune adaptativa, analisando o perfil fenotípico de células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺, para verificar se haveria uma correlação entre a ausência do P2X7R, a redução na ativação dos linfócitos e a atenuação da doença. A estratégia de *gates* utilizada para esta análise é mostrada da figura 9A.

Pode-se notar que os valores de frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ foram semelhantes entre os camundongos C57BL/6 e P2X7RKO controles e também entre os animais infectados com as mesmas cepas (fig. 9B). Entretanto, é evidenciado uma menor quantidade de células CD4⁺ e CD8⁺ nos pulmões dos animais P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 em relação àqueles dos camundongos C57BL/6 infectados com esta mesma cepa (fig. 9C). Nos camundongos P2X7RKO infectados com a estirpe MP287/03, o oposto foi observado, ou seja, houve um aumento no número de células CD4⁺ e CD8⁺ (fig. 9C). Nenhuma diferença significativa foi notada nos animais infectados com a cepa H37Rv (fig. 9C).

Figura 9: Fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ infiltrados nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. No 28^o dia de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas, semeadas em placas de cultura e marcadas com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8. (A) Estratégia de *gates* utilizados. (B) Frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (gate realizado a partir da população de linfócitos). Número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (C). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

Quando analisamos a população de células CD19⁺ não observamos grande diferença na frequência dessa população entre os camundongos C57BL/6 e os P2X7RKO infectados com as mesmas cepas. No entanto, pôde ser notado uma menor número de células CD19⁺ presentes no pulmão de camundongos P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 em relação ao C57BL/6 infectados com a mesma cepa (fig. 10B).

Figura 10: Fenotipagem de linfócitos B (CD19⁺) presentes nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. Com 28 dias de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas, semeadas em placas de cultura e marcadas com os anticorpos anti-CD19 e anti-CD8. (A) Frequência de linfócitos CD19⁺. (B) Número de linfócitos CD19⁺. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

4.1.4 Avaliação do perfil de ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ no pulmão

Posteriormente decidimos avaliar o perfil de ativação dessas células CD4⁺ e CD8⁺. Como mostrado na figura 11A, podemos notar que os animais controles C57BL/6 e P2X7RKO apresentaram predomínio de células CD4⁺CD62L^{high}CD44⁻. Entretanto, nas duas linhagens de animais (C57BL/6 e P2X7RKO) infectadas com qualquer uma das três cepas avaliadas (H37Rv, Beijing 1471 e MP287/03) pôde ser observado a prevalência da população CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ (fig. 11A).

Notamos que a frequência dessas subpopulações de células CD4⁺ entre os camundongos C57BL/6 e P2X7RKO, infectados com as mesmas cepas, foi próxima (fig.11A). No entanto, percebe-se que houve um menor número de células CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ presentes nos pulmões dos animais P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 em relação ao dos animais C57BL/6 infectados com a mesma estirpe (fig. 11B). Por outro lado, os animais P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 apresentaram maior quantidade dessa população (CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺) do que os C57BL/6 (fig. 11B).

Em seguida, determinarmos a frequência da população de células CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ que expressava o marcador de ativação inicial CD69. Como apenas a população CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ expressava esse marcador, os histogramas mostrados na figura 11C são referentes a esta população. Pôde-se notar que os animais C57BL/6 infectados com a cepa Beijing 1471 possuíam uma maior população de células CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺CD69⁺ em relação aos animais P2X7RKO infectados com a mesma cepa (fig. 11C).

Uma resposta oposta foi identificada nos camundongos infectados com a estirpe MP287/03. A população CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ dos animais C57BL/6 infectados com essa cepa apresentaram baixa expressão de CD69, como observado na figura 8C. No entanto, parte da população de células CD4⁺CD62L^{low}CD44⁺ dos camundongos P2X7RKO infectados com essa cepa MP287/03 apresentou alta expressão de CD69 (fig. 11C). Não foi observado diferença na expressão de CD69 entre os animais das duas linhagens infectados com a cepa H37Rv.

Figura 11: Perfil de ativação de linfócitos T CD4⁺ presentes nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. Com 28 dias de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas, semeadas em placas de cultura e marcadas com os anticorpos anti-CD4, anti-CD44, anti-CD62L e anti-CD69. (A) Expressão dos marcadores CD44 e CD62L em linfócitos T CD4⁺. (B) Número total de linfócitos T CD4⁺ CD62L^{high} CD44⁻ e de linfócitos T CD4⁺ CD62L^{low} CD44⁺ presentes no pulmão. (C) Expressão de CD69 em linfócitos T CD4⁺ CD62L^{low} CD44⁺. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

Na avaliação das células CD8⁺, também pode ser observado que as três cepas micobacterianas induziram aumento da população células CD8⁺CD44⁺CD62L^{low} em relação ao controle. Além do mais, uma terceira população de células CD8⁺, CD8⁺CD44⁺CD62L^{high}, foi identificada no pulmão desses animais, exceto no C57BL/6 infectado com a cepa MP287/03 (fig. 12A).

Pode-se notar que os animais C57BL/6 e P2X7RKO infectados com a cepa H37Rv apresentaram alta frequência de ambas populações CD8⁺CD44⁺CD62L^{low} e CD8⁺CD44⁺CD62L^{high} (fig. 12A). Entretanto, os animais infectados com as cepas Beijing 1471 ou MP287/03 apresentaram alta frequência de células CD8⁺CD44⁺CD62L^{low} e baixa frequência de CD8⁺CD44⁺CD62L^{high} (fig. 12A). Quando comparamos a frequência das populações observadas nos camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as mesmas cepas, notamos que os valores eram semelhantes, exceto para os animais infectados com a cepa MP287/03. Neste último caso percebemos que camundongos P2X7RKO infectados com a bactéria MP287/03 apresentaram maior frequência de células CD8⁺CD44⁺CD62L^{high} do que os animais C57BL/6 (fig. 12A).

Percebe-se, no entanto, que apesar dos valores de frequência de células entre os animais de ambas linhagens infectados com Beijing 1471 serem próximos, houve menor quantidade de células CD8⁺CD44⁺CD62L^{low} no pulmão dos camundongos P2X7RKO do que no dos animais C57BL/6 (fig. 12B). O oposto foi observado nos animais infectados com a cepa MP287/03, ou seja, uma maior quantidade de células CD8⁺CD44⁺CD62L^{low} nos animais P2X7RKO do que nos animais C57BL/6 (fig. 12B). Além do mais, uma maior quantidade de células CD8⁺CD44⁺CD62L^{high} também foi observada nos animais P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 do que nos C57BL/6 infectados com essa mesma cepa.

Assim como verificado na população de células CD4⁺, também pode ser observado menor expressão de CD69 na população CD8⁺CD44⁺CD62L^{low} dos animais P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 em relação a dos animais C57BL/6 (fig. 12C). Por outro lado, os animais P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 apresentaram maior expressão de CD69 em relação a dos animais C57BL/6 infectados com essa mesma cepa (fig. 12C).

Figura 12: Perfil de ativação de linfócitos T CD8⁺ presentes nos pulmões de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com as três cepas micobacterianas. No 28^o dia de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas, semeadas em placas de cultura e marcadas com os anticorpos anti-CD8, anti-CD44, anti-CD62L e anti-CD69. (A) Expressão dos marcadores CD44 e CD62L em linfócitos T CD8⁺. (B) Número de linfócitos T CD8⁺ CD62L^{high} CD44⁺, linfócitos T CD8⁺ CD62L^{low} CD44⁺ e de linfócitos T CD8⁺ CD62L^{high} CD44⁺. (C) Expressão de CD69 em linfócitos T CD4⁺ CD62L^{low}CD44⁺. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

4.1.5 Produção de citocinas *ex vivo* de células infiltradas no pulmão

Em nosso estudo também avaliamos a produção de citocinas *ex vivo* de células obtidas do pulmão de animais C57BL/6 e P2X7RKO. Como mostrado na figura 13A, pôde-se detectar níveis mais elevados de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de animais C57BL/6 infectados com a cepa Beijing 1471 do que naqueles dos camundongos P2X7RKO. Todavia, o oposto foi observado nos camundongos infectados com a cepa MP287/03, ou seja, os animais C57BL/6 infectados com essa cepa apresentaram níveis baixos de IFN- γ do que os camundongos P2X7RKO (fig. 13A).

Paralelamente a produção de IFN- γ , também avaliamos a produção de IL-10 (fig. 13B). Observamos que nos animais infectados com Beijing 1471 havia níveis mais altos dessa citocina nos sobrenadantes dos camundongos P2X7RKO do que nos dos C57BL/6 (fig. 13B). Entretanto, nos animais infectados com a cepa MP287/03, maiores concentrações de IL-10 foram detectadas nos sobrenadantes dos animais C57BL/6 do que nos dos camundongos P2X7RKO infectados com a mesma cepa (fig. 13B).

Figura 13: Produção de citocinas (IFN γ e IL-10) *ex vivo* infectados com as três cepas micobacterianas. Células obtidas dos pulmões dos camundongos foram semeadas em meio de cultura. Após 12 horas de cultivo foi coletado o sobrenadante para quantificação das citocinas. (A) Concentrações de IFN γ e (B) IL-10. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 6$.

4.2 Estudos da tuberculose em camundongos quiméricos de medula óssea induzida pela cepa hipervirulenta MP287/03

4.2.1 Análise da reconstituição da medula óssea das quimeras

Posteriormente, nós nos perguntamos se de fato seria a presença do P2X7R expresso nas células derivadas da medula óssea que conferiam maior susceptibilidade frente à infecção por micobactérias hipervirulentas. Para respondermos essa pergunta, fizemos camundongos quiméricos de medula óssea. Na execução desse experimento parte do grupo de camundongos C57BL/6 CD45.1 irradiado foi transplantado com a medula óssea proveniente de animais C57BL/6 (C57BL/6>C57BL/6) e a outra parte com a de P2X7RKO (P2X7RKO>C57BL/6). Em seguida, antes de realizarmos a infecção das quimeras, avaliamos o perfil de reconstituição desses animais, para nos certificarmos de que o procedimento havia sido bem sucedido. A figura 14 mostra o percentual de reconstituição, no sangue e nos pulmões, de camundongos C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6. É possível notar que mais de 95% dos leucócitos presentes no sangue e no pulmão das quimeras são CD45.2⁺ (provenientes do doador), e menos de 3% são CD45.1⁺ (provenientes do receptor) (fig. 14).

Figura 14: Reconstituição das quimeras após 3 meses de transplante (análise do sangue e do pulmão). Células obtidas do sangue e dos pulmões dos camundongos quiméricos 3 meses após a irradiação foram semeadas em placas de cultura e marcadas com anticorpos anti-CD45.1 e anti-CD45.2. Expressão dos marcadores CD45.1 e CD45.2 em amostras de sangue e dos pulmões provenientes dos animais C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6.

4.2.2 Avaliação macroscópica do pulmão

Nós mostramos recentemente que as diferenças observadas entre os animais C57BL/6 e P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 eram mais acentuadas do que nos infectados com as cepas Beijing 1471 e H37Rv (AMARAL et al., 2014). Portanto, optamos por utilizar a cepa MP287/03 nos modelos quiméricos. Primeiramente, nós avaliamos macroscopicamente os pulmões provenientes dos animais C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 e comparamos com os de um animal C57BL/6>C57BL/6 não infectado (CTRL). Paralelamente, usamos camundongos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com a mesma cepa (MP287/03) para termos como referência do desenvolvimento da doença nesses animais.

O isolado clínico MP287/03 induziu uma doença mais severa nos animais C57BL/6, levando-se em consideração a área ocupada pela formação de granulomas (nódulos esbranquiçados) e também o peso pulmonar do que nos animais P2X7RKO (fig. 15A e B), conforme já havia sido descrito em nosso trabalho publicado recentemente (AMARAL et al., 2014). Além do mais, a massa relativa do pulmão (quociente da massa do pulmão infectado pela massa do pulmão controle) também foi maior nos animais C57BL/6 do que P2X7RKO (fig. 15C). Pode-se notar que os animais quiméricos apresentaram essas mesmas características pulmonares resultantes da infecção, ou seja, os camundongos C57BL/6>C57BL/6 manifestaram uma doença mais agressiva, caracterizada por maior área ocupada por granulomas e peso pulmonar do que os P2X7RKO>C57BL/6 (fig. 15A, B e C).

A)

B)

C)

Figura 15: Análise macroscópica dos pulmões de camundongos C57BL/6, P2X7RKO e quimérios (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03. No 28º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os pulmões coletados para análise. (A) Fotografia revelando a presença de nódulos brancos no pulmão de camundongos infectados. (B) Peso do pulmão dos camundongos em gramas apresentados individualmente (n = 6). (C) Massa relativa do pulmão expressa em circunferências. A massa relativa do pulmão foi calculada através do quociente da massa do pulmão infectado pela massa do pulmão controle. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados por One-way ANOVA seguido do pós-teste T de student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. n = 3.

4.2.3 Número total de células infiltradas no pulmão e morte celular

Assim como o observado anteriormente nos animais não quiméricos C57BL/6 e P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 (ver seção 4.1 fig. 3), os animais P2X7RKO>C57BL/6 apresentaram menor quantidade de células infiltradas no pulmão do que os C57BL/6>C57BL/6 (fig. 16A). Em seguida, avaliamos a viabilidade dessas células infiltradas no pulmão e notamos que nos animais C57BL/6 havia uma maior frequência de células mortas do que nos P2X7RKO (fig. 16C e D). Quando verificamos a viabilidade das células isoladas dos pulmões dos animais quiméricos, percebemos mais uma vez que os resultados se aproximavam dos observados nos não quiméricos, ou seja, um maior percentual de mortalidade celular foi observado nos animais C57BL/6>C57BL/6 do que nos P2X7RKO>C57BL/6 (fig. 16C e D).

Figura 16: Análise do número total de células presentes no pulmão dos camundongos C57BL/6, P2X7RKO e quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03 e avaliação da morte celular *in vivo*. Os pulmões dos camundongos foram removidos no 28º dia de infecção e em seguida processado para contagem do número total de células. (A) Número total de células infiltradas no pulmão. (B) Estratégia de *gates* utilizada para análise da morte celular *in vivo*. (C) Frequência de células vivas (baixa fluorescência) e mortas (alta fluorescência) marcadas com Live/Dead. (D) Porcentagem de morte celular observada nos animais não quiméricos (C57BL/6 e P2X7RKO) e no quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 3$.

4.2.4 Número de UFCs no pulmão, baço e fígado

Também analisamos a quantidade de UFCs presente no pulmão, baço e fígado dos animais C57BL/6, P2X7RKO e quiméricos. Nos animais P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 há menor quantidade de UFCs do que nos C57BL/6 em todos os três órgãos avaliados (fig. 17A). Além do mais, nota-se que nos animais quiméricos P2X7RKO>C57BL/6 também há menor quantidade de UFCs do que nos C57BL/6>C57BL/6 (fig. 17B), reproduzindo o observado nos animais não quiméricos (fig. 4B).

Figura 17: Análise do número de UFCs presentes no pulmão, baço e fígado de camundongos C57BL/6, P2X7RKO e quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03. Os camundongos foram sacrificados no 28º dia de infecção e em seguida o pulmão, baço e fígado foram coletados, processados e uma alíquota de cada órgão foi semeada em meio Ágar para quantificação de UFCs. Os gráficos mostram as UFCs do pulmão, baço e fígado nos animais não quiméricos C57BL/6 e P2X7RKO (A) e nos quiméricos C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6 (B). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados pelo teste T de student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 3$.

4.2.5 Fenotipagem do infiltrado leucocitário pulmonar

Decidimos então avaliar as características fenotípicas do infiltrado leucocitário pulmonar nas quimeras, com o intuito de identificar se elas apresentariam um perfil semelhante ao observado inicialmente nos animais não quiméricos C57BL/6 e P2X7RKO. Na análise das quimeras utilizamos o mesmo esquema de *gates* usado anteriormente para os animais não quiméricos (ver seção 4.2 fig. 4A). Inicialmente avaliamos a expressão de CD11b e F4/80 na população de células viáveis das quimeras e constatamos que esses animais também apresentavam populações semelhantes aos não quiméricos (fig. 18A). O controle não infectado quimérico (CTLR) apresentou uma população CD11b⁻ e três populações CD11b⁺ (CD11b⁺F4/80^{high}, CD11b⁺F4/80^{low} e CD11b⁺F4/80⁻) (fig. 18A) semelhante aos controles não quiméricos (fig. 4B). Os camundongos C57BL/6>C57BL/6 infectados apresentaram uma única população CD11b⁺ (fig. 18A), característica também observada nos animais C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 (fig. 4B). A expressão dos marcadores Ly6G, Ly6C e CD11c também foi avaliada (fig. 18B, C e D), e notamos que o perfil fenotípico leucocitário observado nos animais C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6 reproduziu o observado nos não quiméricos C57BL/6 e P2X7RKO, respectivamente.

Figura 18: Fenotipagem de células CD11b⁺ infiltradas nos pulmões de camundongos quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03. No 28º dia de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas e marcadas com os anticorpos anti-CD11b, anti-F4/80, anti-Ly6G e anti-CD11c. (A) Frequência de células CD11b⁺. (B) Frequência de células Ly6G⁺ selecionadas a partir do CD11b⁺. (C) Expressão de CD11c das células F4/80^{hi} selecionadas a partir do grupo CD11b⁺Ly6G^{int}F4/80^{high}. (D) Expressão de CD11c e Ly6C nas células F4/80^{low} selecionadas a partir do grupo CD11b⁺Ly6G^{int}F4/80^{low}. n = 3.

Ao analisarmos os linfócitos T evidenciamos que nos camundongos C57BL/6>C57BL/6 infectados havia menor quantidade de células T CD4⁺ e CD8⁺ do que nos P2X7RKO>C57BL/6 (fig. 19B). As mesmas diferenças entre as quantidades de linfócitos também foram observadas entre os não quiméricos, ou seja, nos animais P2X7RKO havia maior quantidade de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ do que nos C57BL/6 (fig. 9).

Figura 19: Fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ presentes nos pulmões de camundongos quiméricos (C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6) infectados com a cepa MP287/03. Com 28 dias de infecção, as células oriundas do pulmão dos camundongos foram isoladas, semeadas em placas de cultura e marcadas com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8. (A) Frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. (B) Número total de linfócitos T CD4⁺ e de linfócitos T CD8⁺. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão e foram analisados pelo teste T de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 3$.

5 DISCUSSÃO

Estudos prévios haviam demonstrado que o P2X7R está envolvido na resposta imune e confere proteção contra diversos patógenos, como parasitas do gênero *Leishmania*, *Chlamydia*, *Toxoplasma* entre outros (CHAVES et al., 2009; CORREA et al., 2010; COUTINHO-SILVA et al., 2003). Entretanto, nós mostramos recentemente que camundongos P2X7RKO, quando infectados com as cepas hipervirulentas Beijing 1471 e MP287/03, apresentam uma doença mais branda do que os animais C57BL/6 (AMARAL et al., 2014). Partindo desse pressuposto, nós decidimos avaliar o papel do P2X7R na resposta imune contra cepas hipervirulentas de micobactérias e de que forma ele estaria correlacionado com a amenização da patologia induzida por estes micro-organismos.

Analizamos primeiramente o número de células totais presentes no pulmão, e de acordo com o observado por Amaral e colaboradores (AMARAL et al., 2014) pôde-se notar que os animais P2X7RKO apresentaram menor quantidade de células infiltradas no pulmão do que os C57BL/6. Decidimos então avaliar as características fenotípicas do infiltrado leucocitário pulmonar, para verificar se havia diferença no perfil de recrutamento e ativação de células. Nos animais C57BL/6 infectados com Beijing 1471 notamos que havia uma maior quantidade de células Ly6G⁺ do que nos animais P2X7RKO. Segundo Fleming e colaboradores, Ly6G é uma molécula altamente expressa na superfície de neutrófilos (FLEMING; FLEMING; MALEK, 1993), portanto, inferimos que nesses animais (C57BL/6) havia uma maior quantidade de neutrófilos. De fato, Kawamura e colaboradores mostraram no seu estudo em 2012 que o estímulo do P2X7R com ATPe induz os macrófagos a produzirem MIP-2, o qual promove um maior recrutamento de neutrófilos (KAWAMURA et al., 2012). A ausência de tal evento pode ter colaborado para a menor quantidade de neutrófilos nos animais P2X7RKO. Entretanto, nós também havíamos mostrado que nos animais P2X7RKO havia menor número de bactérias do que nos P2X7RKO (AMARAL et al., 2014). Portanto, uma outra hipótese é que a menor quantidade de neutrófilos presente nos animais P2X7RKO pode também ser decorrente da menor quantidade de bactérias presentes nesses animais, que consequentemente induziria uma menor inflamação. Os animais P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 também apresentaram essa população de neutrófilos, entretanto os camundongos C57BL/6 infectados com essa mesma cepa apresentaram uma população com características distintas do observado nos demais animais, e será discutida posteriormente.

Os macrófagos teciduais são outra classe de células que possuem um papel importante na resposta imune no pulmão. Baseado na localização anatômica nesse órgão, os macrófagos podem ser classificados em duas subpopulações: Macrófagos alveolares, localizados no espaço aéreo alveolar, e macrófagos intersticiais, situados nos tecidos conectivos do pulmão. A principal função dos macrófagos alveolares é remover partículas e micro-organismos do espaço intra-alveolar, enquanto que os macrófagos intersticiais têm um papel imunorregulatório bastante importante, através da produção de IL-10 (BEDORET et al., 2009; JI et al., 2014; SCHNEBERGER; AHARONSON-RAZ; SINGH, 2011; STEINMULLER et al., 2000). Além do mais, quando ativados os macrófagos alveolares possuem uma capacidade microbida elevada se comparados com os macrófagos intersticiais, com forte produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e óxido nítrico (NO) (STEINMULLER et al., 2000). Devido ao papel primordial dos macrófagos na tuberculose, decidimos avaliar se também ocorria alterações nessas subpopulações de macrófagos durante um processo infeccioso induzido por micobactérias. Os macrófagos alveolares são caracterizados pela expressão de F4/80 e CD11c (F4/80^{high}CD11c⁺), já os macrófagos intersticiais expressam F4/80 mas não possuem CD11c (F4/80^{high}CD11c⁻). Pôde ser notado que os camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Beijing 1471 apresentaram uma quantidade muito superior, aproximadamente 7 vezes maior, de macrófagos alveolares do que os controles não infectados desta mesma linhagem (fig. 7). Por outro lado, não observamos um aumento tão proeminente de macrófagos intersticiais quanto o de macrófagos alveolares nesses animais C57BL/6 infectados com Beijing 1471. A pequena elevação dessa população de macrófagos intersticiais, com propriedades imunorregulatórias, associada com o enorme aumento de macrófagos alveolares, com potentes atividades microbidas, pode ter causado um desequilíbrio na regulação da resposta imune e consequentemente contribuído para a maior destruição tecidual observada no pulmão dos animais C57BL/6 infectados com Beijing 1471. Amaral (2011) havia mostrado em sua dissertação que a intensa lesão tecidual promovida pela cepa Beijing 1471 é causada pela ativação excessiva da resposta imune protetora, o que reforça nossa hipótese. Já nos animais P2X7RKO, também infectados com a cepa Beijing 1471, a quantidade de ambos os macrófagos foi menor do que a dos animais C57BL/6 infectados com essa cepa. Além do mais, percebe-se que a população de macrófagos alveolares não foi tão grande quanto o

observado nos animais C57BL/6. O fato de não haver uma enorme diferença na quantidade de macrófagos com potenciais microbicidas elevados e macrófagos com capacidade imunorregulatórias podem ter colaborado para a menor destruição tecidual desses animais P2X7RKO. Entretanto, é importante salientar que nos animais C57BL/6 infectados com Beijing 1471 há maior quantidade de bactérias do que nos P2X7RKO (AMARAL et al., 2014). Portanto, uma outra hipótese é que a maior quantidade de bactérias presentes nos animais C57BL/6 poderia ter causado uma maior ativação da resposta imune e consequentemente maior lesão tecidual. Também foi possível notar que apenas a população de macrófagos alveolares expressou ambos marcados MHC-II e CD80, e que a expressão de MHC-II foi aumentada nos animais infectados em relação ao controle, indicando que esses macrófagos estão ativados (fig. 8).

Outras células muito importantes no combate de doenças infecciosas são os monócitos, que após infecção ou injúria tecidual, migram para o tecido inflamado e se diferenciam em macrófagos e DC (CRANE et al., 2014). Essas células são divididas em dois tipos principais: monócitos inflamatórios, que possuem uma meia vida reduzida e migram para os tecidos inflamados, e os monócitos não inflamatórios, que possuem longo tempo de vida e migram preferencialmente para tecidos não inflamados (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003). Os monócitos são caracterizados pela expressão de CD11b e F4/80, assim como ausência de expressão de marcadores específicos para DC, células B, T e NK. Os monócitos inflamatórios, por sua vez, também possuem alta expressão de Ly6C (Ly6C^{hi}), enquanto os não inflamatórios apresentam baixa expressão desse marcador (Ly6C^{low}). Podemos perceber que nos animais infectados houve um grande aumento do número de monócitos inflamatórios (CD11c⁺Ly6C^{hi}), e nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos monócitos não inflamatórios. Pôde ser notado também que os animais P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 apresentaram menor quantidade de monócitos inflamatórios do que os animais C57BL/6 infectados com essa mesma cepa (fig. 9). Esses resultados evidenciam que nos animais C57BL/6 infectados com Beijing 1471, em que ocorre um maior processo inflamatório, existe também uma maior quantidade de monócitos inflamatórios no sítio infeccioso.

Também notamos, nessa análise, que havia a presença de duas subpopulações que expressavam CD11c: CD11c⁺Ly6C⁻ e CD11c⁺Ly6C⁺. León e

colaboradores revelaram em 2007 uma população de células caracterizada pela expressão de MHC-II, CD11b, CD11c, F4/80 e Ly6C, a qual eles a chamaram de DC inflamatórias, devido a elas serem derivadas de monócitos inflamatórios e só serem encontradas em locais de inflamação (LEON; LOPEZ-BRAVO; ARDAVIN, 2007). Entretanto, Gautier e colaboradores mostraram que macrófagos residentes teciduais apresentam vários receptores em comum com DC inflamatórias (GAUTIER et al., 2012). A população de células CD11c⁺Ly6C⁺ que observamos nos animais infectados apresenta estas características, portanto, inferimos que provavelmente é uma população de monócitos inflamatórios que está se diferenciando em DCs inflamatórias e/ou em macrófagos alveolares. Podemos notar que nos animais infectados com a cepa Beijing 1471, os quais apresentaram uma maior lesão tecidual do que os infectados com a cepa H37Rv, há uma maior quantidade dessa população CD11c⁺Ly6C⁺. Além disso, os animais P2X7RKO infectados com a estirpe Beijing 1471 apresentaram menor quantidade dessas células duplo-positivas do que os animais C57BL/6. Em relação às DCs residentes convencionais (CD11c⁺Ly6C⁻) não foi identificada nenhuma diferença entre os animais C57BL/6 e P2X7RKO infectados.

Os animais C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 apresentaram uma única população, a qual era completamente distinta das observadas nos demais camundongos. Essa população expressa CD11b e níveis intermediários de Ly6G. Embora houvesse apenas uma única população, decidimos subdividi-la utilizando os três *gates* usados para as demais análises. Também foi possível observar que nenhuma das subdivisões expressavam MHC-II e CD80. Vários estudos já mostraram que células com fenótipo mielóide imaturo possuem capacidade imunossupressora, inibindo a produção de anticorpo, a geração de CTL (linfócito T citotóxico), bem como ativação e proliferação de linfócitos T CD4⁺ (MAZZONI et al., 2002). Essas células, denominadas células mielóides supressoras (MDSC) foram primeiramente descritas em pacientes com câncer, no entanto, hoje se sabe que elas estão presentes em diversas outras condições patológicas, incluindo doenças infecciosas (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009). As MDSCs são comumente identificadas em camundongos pela coexpressão dos marcadores de superfície CD11b e GR1 (Ly6C/Ly6G) (AROCENA et al., 2014). Neutrófilos e MDSCs compartilham de características morfológicas e fenotípicas semelhantes, pois ambas são granulócitos e expressam CD11b e Ly6G, mas as MDSC expressam níveis

intermediários de Ly6G enquanto que os neutrófilos apresentam alta expressão desse marcador (OBREGON-HENAO et al., 2013; YOUN et al., 2012). As células que identificamos nos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 apresentavam as características de MDSC. De fato, Obregon-Henao e colaboradores mostraram em seu trabalho publicado recentemente que em camundongos infectados com *Mtb* havia a presença de MDSC infiltrada no pulmão (OBREGON-HENAO et al., 2013). Com base nesses dados especulamos que a presença maciça dessas células no pulmão possa ter afetado a ativação da resposta imune, e consequentemente no controle da proliferação bacteriana, o que pode ter acarretado na maior severidade da doença nesses camundongos. O fato desses animais estarem num estágio muito avançado da doença, com intensa lesão tecidual, pode explicar a ausência das demais populações, pois como tentativa de controlar a lesão do parênquima pulmonar altamente comprometido e necrosado, o sistema imune pode ter induzido a liberação de células imaturas da medula óssea com potencial imunossupressor para reter o avanço do dano tecidual. Já nos animais P2X7RKO, também infectados com a cepa MP287/03 e que possuem menor lesão tecidual, podemos identificar todas as populações observadas nos demais camundongos infectados, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e monócitos. Amaral e colaboradores perceberam que nesses camundongos P2X7RKO haviam menor proliferação, disseminação bacteriana e dano tecidual (AMARAL et al., 2014), fato que pode ter colaborado para um perfil de resposta imune mais próximo do observado nos animais infectados com a cepa H37Rv, de menor virulência.

Tendo observado o perfil fenotípico da resposta imune inata induzida por cepas micobacterianas, decidimos avaliar também a resposta imune adaptativa, para verificar se também ocorriam diferenças no recrutamento e no perfil de ativação dessas células. Nas primeiras análises realizadas já foi possível notar diferença nos números de linfócitos T nos pulmões. Enquanto nos animais P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 havia menor quantidade de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ do que nos animais C57BL/6, nos camundongos P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 havia maior quantidade de ambos subtipos de linfócitos do que nos C57BL/6. Além do mais, foi possível perceber que a maior quantidade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos pulmões dos animais infectados foi decorrente principalmente da elevação do número de células experimentadas (CD44⁺CD62L⁻).

Resolvemos então avaliar o perfil de ativação desses linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ experimentados através da expressão do marcador precoce de ativação celular CD69. Pôde-se notar que nos animais C57BL/6 infectados com a cepa Beijing 1471 havia grande ativação de linfócitos T. Esses dados corroboram estudos realizados anteriormente em nosso laboratório que mostraram que esta cepa induz uma potente resposta pró-inflamatória em camundongos C57BL/6 (AMARAL, 2011). Por outro lado, os animais P2X7RKO infectados com essa mesma cepa, Beijing 1471, apresentaram menor ativação de linfócitos do que os C57BL/6. Como o ATPe é um sinal coestimulatório que contribui para a ativação de linfócitos T na sinapse imunológica, na qual a ativação do P2X7R também está envolvida (JUNGER, 2011; SCHENK et al., 2008; YIP et al., 2009), a ausência desse receptor pode ter colaborado para redução da ativação dessas células. Além do mais, nós havíamos mostrado recentemente que nesses camundongos P2X7RKO haviam menor proliferação e disseminação bacteriana (AMARAL et al., 2014), fato que também pode ter colaborado para uma menor ativação da resposta imune.

Já nos animais infectados com a cepa MP287/03 observamos uma reposta oposta. Foi possível perceber que havia uma baixa ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos animais C57BL/6. Esses dados também estão de acordo com o observado em estudos anteriores (ANDRADE et al., 2012), que mostraram que esta bactéria induz baixa produção de citocinas pró-inflamatórias e uma produção mais acentuada de IL-10 em cultura de macrófagos. Entretanto, nos animais P2X7RKO infectados com essa mesma cepa, MP287/03, havia maior ativação de linfócitos T. Embora vários estudos tenham revelado que o ATPe promove ativação de células e resposta pró-inflamatória, os produtos resultantes do metabolismo do ATP, como a adenosina, exercem um efeito anti-inflamatório (JUNGER, 2011; YIP et al., 2007). Através da ligação aos receptores A_{2A} e A_{2b} a adenosina pode inibir a produção de IL-2 e, consequentemente, a ativação de linfócitos (YIP et al., 2007). Nós postulamos que a intensa lesão tecidual observada nos animais C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 resultou em liberação maciça de ATP, que foi metabolizado pelas ectonucleotidases produzindo grandes quantidades de adenosina, a qual potencializou o efeito inibitório induzido pela cepa. Além do mais, nesses animais foi encontrada uma grande quantidade de células com fenótipo de MDSCs, o que pode ter intensificado ainda mais o efeito imunossupressor. De fato, alguns estudos mostram que as MDSCs reduzem a resposta imune protetora executada por

linfócitos T contra a Mtb, limitando a erradicação do patógeno pelo hospedeiro e, consequentemente, contribuindo para agravação da doença (DU PLESSIS et al., 2013; TSIGANOV et al., 2014). Porém, devido aos animais P2X7RKO infectados com essa cepa apresentaram menor lesão tecidual, deve ter ocorrido menor liberação de ATP e, consequentemente, de adenosina. Portanto, o efeito imunossupressor exercido pela adenosina seria menor, além de não ter sido identificadas MDSCs nesses animais. Ainda que a sinalização via P2X7R colabore para a ativação e proliferação de linfócitos T, outros receptores de ATPe como P2X1 e P2X4 também contribuem para essa função (JUNGER, 2011). Dessa forma, a ausência do P2X7R não coíbe completamente a proliferação linfocitária, o que justifica ainda ocorrer ativação e proliferação de linfócitos T nesses animais P2X7RKO. Juntos, esses resultados indicam que o forte efeito inibitório exercido pela grande quantidade de adenosina no meio extracelular somado a imunossupressão induzida pelas MDSCs podem ter sido a causa da menor ativação de linfócitos T nos animais C57BL/6 infectados com MP287/03 em relação aos P2X7RKO.

Mais especificamente nos linfócitos T CD8⁺, pôde ser observado a presença de uma terceira população: CD44⁺CD62L^{high}. Esta população celular, denominada de linfócitos T de memória central (T_{cm}), é caracterizada pelo seu longo período de vida, alta capacidade proliferativa e funções efetoras reduzidas. Por sua vez, a população CD8⁺ CD44⁺CD62L^{low}CD69⁺ é composta por linfócitos T CD8⁺ efetores (T_e) e de memória efetores (T_{em}). As células T_{cm} diferem das células T_e, que possuem curto período de vida, e das células T_{em}, que apresentam baixa capacidade proliferativa e elevada atividade efetora (KAECH et al., 2002; TUFAIL et al.; WHERRY et al., 2003). Os linfócitos T_{em} são células que foram primadas com antígeno e que estão prontamente disponíveis para migrar para os tecidos periféricos e mediar reações inflamatórias ou citotóxicas, enquanto que os linfócitos T_{cm} representam uma população também primada com antígeno, porém que migram para os órgãos linfoides secundários, e após um desafio subsequente podem gerar uma nova população de células efetoras (SALLUSTO et al., 1999). Nota-se que os animais infectados com a cepa H37Rv apresentaram alta frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores e/ou de memória efetores (CD44⁺CD62L^{low}), bem como de memória central em ambas linhagens de camundongos C57BL/6 e P2X7RKO. Entretanto, os animais infectados com as cepas Beijing 1471 e MP287/03 apresentaram maior

frequência de células T_e/T_{em} $CD8^+$ do que linfócitos T_{cm} $CD8^+$. Além do mais, os animais C57BL/6 infectados com a cepa MP287/03 praticamente não apresentam células T_{cm} , já os animais P2X7RKO infectados com essa mesma cepa voltam a apresentar essa população. Além do mais, os animais P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 apresentam a população de linfócitos T_{cm} $CD8^+$, porém nos animais C57BL/6 infectados com essa mesma cepa, os quais apresentam uma patologia mais grave, essa população desaparece. Apesar do observado, são necessários estudos com marcadores mais específicos relacionados a memória imunológica, e que sejam capazes de distinguir as populações de linfócitos T_e e T_{em} para compreendermos melhor esse fenômeno.

Como nos animais P2X7RKO houve alteração no perfil de ativação de linfócitos em relação aos animais C57BL/6, decidimos então avaliar se também seria observada alteração na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Amaral mostrou em seu trabalho que animais infectados com a cepa Beijing 1471 havia alta produção da citocina pró-inflamatória $IFN\gamma$ e baixo nível da citocina anti-inflamatória IL-10 (Amaral, 2011). Já a cepa MP287/03 induzia maior produção de IL-10 e baixos níveis de $IFN\gamma$ (Amaral, 2011). Nos animais P2X7RKO infectados com Beijing 1471 foi possível notar que havia uma menor quantidade de $IFN\gamma$ e níveis maiores de IL-10 em relação aos C57BL/6. Por outro lado, nos camundongos P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 níveis mais altos de $IFN\gamma$ e taxas menores de IL-10 foram detectados em relação aos C57BL/6. Esses resultados corroboram os dados de ativação de linfócitos T, uma vez que nos camundongos P2X7RKO infectados com a cepa Beijing 1471 havia menor ativação de linfócitos do que nos C57BL/6, enquanto que nos P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 ocorria maior ativação em relação aos C57BL/6 infectados com a mesma cepa.

Vimos, portanto, que os animais C57BL/6 infectados com cepas hipervirulentas, Beijing 1471 e MP287/03, apresentaram um perfil de resposta imune completamente diferente do observado nos P2X7RKO. Embora o P2X7R tenha sido estudado primeiramente na linhagem hematopoiética, vários trabalhos têm mostrado a expressão desse receptor em diferentes células do tecido pulmonar, como as células epiteliais alveolares do tipo I, células endoteliais e fibroblastos (CHEN et al., 2004; MCCLENAHAN et al., 2009; MISHRA, 2013; MONCAO-RIBEIRO et al., 2014; OLIVEIRA; COUTINHO-SILVA; SILVA, 2013). Sendo os animais C57BL/6 mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença do que os P2X7RKO, nos

perguntamos então se seria a presença do P2X7R nas células derivadas da medula óssea (linhagem hematopoiética) que conferia essa maior susceptibilidade a esses animais, ou se a expressão desse receptor nas células estruturais do pulmão também seria importante para esse fenótipo. Para responder essa pergunta, optamos por fazer os camundongos quiméricos C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6. Como as diferenças observadas entre os animais C57BL/6 e P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 eram mais acentuadas do que nos infectados com as cepas Beijing 1471 e H37Rv (AMARAL et al., 2014), optamos por utilizar apenas essa cepa (MP287/03) nos modelos quiméricos.

Ao avaliarmos macroscopicamente o pulmão dos camundongos, já puderam ser observadas grandes diferenças. Os animais P2X7RKO infectados com a cepa MP287/03 apresentaram uma doença menos severa em relação aos animais C57BL/6, levando-se em consideração a área ocupada pela formação de granulomas e também o peso pulmonar. Nota-se que os camundongos quiméricos apresentam características patológicas pulmonares semelhantes aos não quiméricos, ou seja, os animais C57BL/6>C57BL/6 possuíram uma doença mais severa do que os P2X7RKO>C57BL/6. Esses resultados indicam que a expressão do P2X7R nas células derivadas da medula óssea é a principal responsável pela susceptibilidade dos animais.

Outros parâmetros também foram avaliados, como o de UFCs no pulmão e a disseminação para outros órgãos, viabilidade celular e fenotipagem do infiltrado leucocitário. Percebemos que em todos esses parâmetros o resultado observado nas quimeras C57BL/6>C57BL/6 e P2X7RKO>C57BL/6 reproduziram o observado nos C57BL/6 e P2X7RKO, respectivamente. Portanto, esses dados mostram que os animais que receberam a medula óssea de camundongos P2X7RKO apresentaram tanto as características patológicas quanto as imunológicas semelhantes aos animais P2X7RKO, sendo mais resistentes do que os que receberam a medula de C57BL/6. Já os animais que receberam a medula óssea dos camundongos C57BL/6 apresentaram uma resposta semelhante aos C57BL/6, como o esperado. Por consequência, especulamos que a cepa MP287/03 utiliza mecanismos dependentes do P2X7R expresso na linhagem hematopoiética que favorecem o agravamento da doença. Esses dados não só confirmam mas também complementam o que já havíamos mostrado recentemente, em experimentos *in vitro*, que as cepas

hipervirulentas Beijing 1471 e MP287/03 induziam a morte de macrófagos por mecanismos dependente de P2X7R (AMARAL et al., 2014).

Com base nos nossos resultados inferimos que apesar das cepas hipervirulentas Beijing 1471 e MP287/03 possuírem capacidades imunomodulatórias opostas, a inexistência do P2X7R parece amenizar, ou pelo menos retardar, a severidade da doença induzida por ambas as cepas. Na infecção promovida pela cepa Beijing 1471, que causa lesão tecidual por ativação excessiva da resposta imune, a ausência do P2X7R reduziu o número de bactérias e a ativação da resposta imune, minimizando dessa forma a necrose do tecido. Por outro lado, nas infecções causadas pela cepa MP287/03, na qual a lesão tecidual é promovida pela baixa ativação da resposta imune e consequentemente intensa proliferação bacteriana, a ausência do P2X7R foi capaz de aumentar a ativação da resposta imunológica e reduzir a carga bacteriana, diminuindo consequentemente a lise celular e a lesão tecidual. E esses mecanismos parecem estar diretamente ligados a expressão do P2X7R na linhagem hematopoiética.

6 CONCLUSÃO

O P2X7R é uma molécula importante para indução da necrose pulmonar e consequentemente da TB severa (AMARAL et al., 2014). Embora as duas cepas hipervirulentas usadas nesse trabalho possuam propriedades imunomodulatórias opostas, Beijing 1471 (pró-inflamatória) e MP287/03 (anti-inflamatória), o P2X7R mostrou-se ter um papel fundamental na modulação da resposta imune induzida por ambas as cepas. Parece que quando há pouca lesão tecidual (infecção causada por H37Rv) ocorre uma resposta imune adequada capaz de controlar a doença, mas quando há elevada lesão tecidual (infecção causada por Beijing 1471) ocorre maior liberação de ATP e exacerbação da resposta imune. Entretanto, quando há destruição maciça do tecido (infecção causada por MP287/03), um ambiente imunossuprimido é gerado, provavelmente pela geração excessiva de adenosina via degradação do ATP. Na ausência do P2X7R, no entanto, ocorre menos lesão tecidual nas infecções induzidas por ambas cepas hipervirulentas, e portanto, o perfil de resposta imune se torna semelhante ao induzido pela cepa de menor virulência H37Rv, reduzindo a ativação imunológica nas infecções causadas pela cepa Beijing 1471 e aumentando nas promovidas pela cepa MP287/03.

Além do mais, a expressão do P2X7R nas células hematopoiéticas parece ser o principal fator envolvido na indução da doença severa, descartando o envolvimento de células estruturais do pulmão que também expressam o P2X7R, como células epiteliais alveolares do tipo I, células endoteliais e fibroblastos.

Figura 20: Modelo esquemático proposto para o envolvimento do P2X7R na modulação da resposta imune pelas cepas hipervirulentas Beijing 1471 e MP287/03.

REFERÊNCIAS

*ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci.**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.

ADINOLFI, E. et al. P2X(7) receptor: Death or life? **Purinergic Signal.**, v. 1, n. 3, p. 219-227, 2005.

AGUILAR, D. et al. Mycobacterium tuberculosis strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. **Tuberculosis (Edinb.)**, v. 90, n. 5, p. 319-325, Sep 2010.

AGUILAR LEON, D. et al. Mycobacterium bovis with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 157, n. 1, p. 139-147, 2009.

Amaral, E. P. **Avaliação da virulência micobacteriana e modulação da resposta imune durante a infecção por isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* E *Mycobacterium tuberculosis***. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

AMARAL, E. P. et al. Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 7, 2014.

ANDRADE, M. R. et al. Pathogenic Mycobacterium bovis strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. **BMC Microbiol.**, v. 12, n. 166, p. 1471-2180, 2012.

ANTONELLI, L. R. et al. Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 5, p. 1674-1682, May 2010.

AROCENA, A. R. et al. Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 44, n. 1, p. 184-194, 2014.

BALDWIN, S. A. et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. **Pflugers Arch.**, v. 447, n. 5, p. 735-743, 2004.

BEDORET, D. et al. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 12, p. 3723-3738, 2009.

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: ATP release. **Neurochem Res.**, v. 26, n. 8-9, p. 959-969, 2001.

BOTHA, L.; VAN PITTIUS, N. C.; VAN HELDEN, P. D. Mycobacteria and disease in southern Africa. **Transbound Emerg Dis.**, v. 1, p. 147-156, 2013.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO De BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília/DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília/DF, 2014.

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

CARDONA, P. J. et al. Towards a 'human-like' model of tuberculosis: intranasal inoculation of LPS induces intragranulomatous lung necrosis in mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand. J. Immunol.**, v. 53, n. 1, p. 65-71, Jan 2001.

CHAVES, S. P. et al. Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 10-11, p. 842-849, 2009.

CHEN, Z. et al. Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and II cells. **Biochem Biophys. Res. Commun.**, v. 319, n. 3, p. 774-780, 2004.

CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 1, p. 257-270, 1995.

CORREA, G. et al. Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 6, p. 497-504, 2010.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 641-676, 2003.

COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. **Microbes Infect.**, v. 14, n. 14, p. 1271-1277, 2012.

COUTINHO-SILVA, R. et al. Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. **Immunity**, v. 19, n. 3, p. 403-412, 2003.

CRANE, M. J. et al. The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. **PLoS One.**, v. 9, n. 1, 2014.

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

DI VIRGILIO, F. et al. Cytolytic P2X purinoceptors. **Cell Death Differ.**, v. 5, n. 3, p. 191-199, 1998.

DORHOI, A.; REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. **Immunol. Rev.**, v. 240, n. 1, p. 235-251, 2011.

DU PLESSIS, N. 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.**, v. 188, n. 6, p. 724-732, 2013.

ELIAS, D. et al. Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF-beta production. **Vaccine**, v. 26, n. 31, p. 3897-3902, 2008.

FAIRBAIRN, I. P. et al. ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. **J. Immunol.**, v. 167, n. 6, p. 3300-3307, 2001.

FATTORINI, L. et al. Exposure of BALB/c mice to low doses of *Mycobacterium avium* increases resistance to a subsequent high-dose infection. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 10, p. 3173-3181, 2002.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R. E.; SITKOVSKY, M. V. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 21, p. 8267-8271, 1990.

FLEMING, T. J.; FLEMING, M. L.; MALEK, T. R. 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.**, v. 151, n. 5, p. 2399-2408, 1993.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 162-174, 2009.

GARNIER, T. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.

GAUTIER, E. L. et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 11, p. 1118-1128, 2012.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, 2003.

GIL, O. et al. Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis* is related to bacterial load rather than to any one cytokine or T cell type. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 3, p. 628-636, Mar 2006.

GRAY, J. H.; OWEN, R. P.; GIACOMINI, K. M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. **Pflugers Arch.**, v. 447, n. 5, p. 728-734, 2004.

GUTIERREZ, M. C. et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog.**, v. 1, n. 1, p. 19, 2005.

HANEKOM, M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. **Tuberculosis (Edinb.)**, v. 91, n. 6, p. 510-523, Nov 2011.

HARISINGHANI, M. G. et al. Tuberculosis from head to toe. **Radiographics.**, v. 20, n. 2, p. 449-70, 2000.

HOUBEN, E. N.; NGUYEN, L.; PIETERS, J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. **Curr. Opin Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 76-85, 2006.

JACOB, F. et al. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. **Purinergic Signal.**, v. 9, n. 3, p. 285-306, Sep 2013.

Jl, W. J. et al. Temporal and spatial characterization of mononuclear phagocytes in circulating, lung alveolar and interstitial compartments in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary injury. **J Immunol Methods**, v. 403, n. 1-2, p. 7-16, 2014.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, Mar 2011.

KAECH, S. M. et al. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. **Cell**, v. 111, n. 6, p. 837-851, 2002.

KAUFMANN, S. H.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P. H. New vaccines for tuberculosis. **Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2110-2119, 2010.

KAWAMURA, H. et al. Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. **Immunology**, v. 136, n. 4, p. 448-458, 2012.

KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2007.

KHAKH, B. S.; NORTH, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**, v. 442, n. 7102, p. 527-532, 2006.

KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. **Semin. Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 35-41, 2004.

LAMMAS, D. A. et al. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. **Immunity**, v. 7, n. 3, p. 433-444, 1997.

LASUNSKAIA, E. et al. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 6, p. 467-475, Jun 2010.

LEON, B.; LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-531, 2007.

LOTZE, M. T. et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. **Immunol. Rev.**, v. 220, p. 60-81, 2007.

MAJLESSI, L. et al. Inhibition of phagosome maturation by mycobacteria does not interfere with presentation of mycobacterial antigens by MHC molecules. **J. Immunol.**, v. 179, n. 3, p. 1825-1833, 2007.

MAZZONI, A. et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. **J. Immunol.**, v. 168, n. 2, p. 689-695, 2002.

MCCLLENAHAN, D. et al. Effects of extracellular ATP on bovine lung endothelial and epithelial cell monolayer morphologies, apoptoses, and permeabilities. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 43-48, Jan 2009.

- MEIKLE, V. et al. Evaluation of pathogenesis caused in cattle and guinea pig by a *Mycobacterium bovis* strain isolated from wild boar. **BMC Vet. Res.**, v. 7, n. 37, p. 1746-6148, 2011.
- MILLER, C. M. et al. The role of the P2X(7) receptor in infectious diseases. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 11, p. 10, 2011.
- MISHRA, A. New insights of P2X7 receptor signaling pathway in alveolar functions. **J. Biomed. Sci.**, v. 20, p. 26, 2013.
- MONCAO-RIBEIRO, L. C. et al. P2X7 Receptor Modulates Inflammatory and Functional Pulmonary Changes Induced by Silica. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110185, 2014.
- MULLER, B. et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. **Emerg Infect. Dis.**, v. 19, n. 6, p. 899-908, 2013.
- NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 599-623, 2004.
- O'GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 31, p. 475-527, 2013.
- OBREGON-HENAO, A. et al. Gr1(int)CD11b+ myeloid-derived suppressor cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **PLoS One**, v. 8, n. 11, 2013.
- OKAFOR, C. C. et al. Descriptive epidemiology of bovine tuberculosis in michigan (1975-2010): lessons learned. **Vet. Med. Int.**, v. 874924, n. 10, p. 30, 2011.
- OLIVEIRA, S. D.; COUTINHO-SILVA, R.; SILVA, C. L. Endothelial P2X7 receptors' expression is reduced by schistosomiasis. **Purinergic Signal**, v. 9, n. 1, p. 81-89, Mar 2013.
- ORME, I. M. et al. 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. **J. Immunol.**, v. 148, n. 1, p. 189-196, 1992.
- OTTENHOFF, T. H.; KAUFMANN, S. H. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 5, p. 10, 2012.
- PRAETORIUS, H. A.; LEIPZIGER, J. ATP release from non-excitabile cells. **Purinergic Signal**, v. 5, n. 4, p. 433-446, 2009.
- RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 12, n. 5, p. 352-366, 2012.
- RUBARTELLI, A.; LOTZE, M. T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. **Trends Immunol.**, v. 28, n. 10, p. 429-436, 2007.
- RYFFEL, B. et al. Innate immunity to mycobacterial infection in mice: critical role for toll-like receptors. **Tuberculosis**, v. 85, n. 5-6, p. 395-405, 2005.
- SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708-712, 1999.

- SCHENK, U. et al. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. **Sci. Signal.**, v. 1, n. 39, p. 1160583, 2008.
- SCHNEBERGER, D.; AHARONSON-RAZ, K.; SINGH, B. Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. **Cell Tissue Res.**, v. 343, n. 1, p. 97-106, 2011.
- SKAPER, S. D.; DEBETTO, P.; GIUSTI, P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. **Faseb J.**, v. 24, n. 2, p. 337-345, 2010.
- SMITH, R. A.; ALVAREZ, A. J.; ESTES, D. M. The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 78, n. 3-4, p. 249-262, 2001.
- SS, M. et al. - Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 4, p. 224-232, 2008.
- STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 1-22, 2012.
- STEINMULLER, C. et al. Local activation of nonspecific defense against a respiratory model infection by application of interferon-gamma: comparison between rat alveolar and interstitial lung macrophages. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 22, n. 4, p. 481-490, 2000.
- STURGILL-KOSZYCKI, S. et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 678-681, 1994.
- SUNDARAMURTHY, V.; PIETERS, J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. **Microbes Infect.**, v. 9, n. 14-15, p. 1671-1679, 2007.
- THWAITES, G. et al. Relationship between Mycobacterium tuberculosis genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 1363-1368, Apr 2008.
- TSIGANOV, E. N. et al. Gr-1dimCD11b+ Immature Myeloid-Derived Suppressor Cells but Not Neutrophils Are Markers of Lethal Tuberculosis Infection in Mice. **J. Immunol.**, v. 7, p. 7, 2014.
- TUFALL, S. et al. Illuminating the Petite Picture of T Cell Memory Responses to. **Biomed Res Int.** v. 2013, p. 10, 2013.
- URDAHL, K. B.; SHAFIANI, S.; ERNST, J. D. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. **Mucosal Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 288-293, 2011.
- VAN HELDEN, P. D.; PARSONS, S. D.; GEY VAN PITTIUS, N. C. 'Emerging' mycobacteria in South Africa. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 80, n. 4, p. 210-214, 2009.
- VERGNE, I. et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 11, p. 4033-4038, 2005.
- WANG, J. et al. Investigation of the effect of Mycobacterium bovis infection on bovine neutrophils functions. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 675-687, 2013.

WHERRY, E. J. et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 225-234, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2013. Geneva, Switzerland: WHO; 2013.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 5, p. 673-694, 2008.

YIP, L. et al. Hypertonic stress regulates T-cell function by the opposing actions of extracellular adenosine triphosphate and adenosine. **Shock**, v. 27, n. 3, p. 242-250, 2007.

YIP, L. et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. **Faseb J.**, v. 23, n. 6, p. 1685-1693, 2009.

YOUN, J. I. et al. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 91, n. 1, p. 167-181, 2012.

YOUNG, D. B. et al. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **J Clin Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1255-1265, 2008.

YOUNG, M. T. P2X receptors: dawn of the post-structure era. **Trends Biochem. Sci.**, v. 35, n. 2, p. 83-90, 2010.