

EDUARDO PINHEIRO AMARAL

Intervenção em vias de sinalização associadas ao reconhecimento de dano celular visando reduzir a imunopatologia das formas graves de tuberculose

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

São Paulo
2015

RESUMO

Amaral EP. Intervenção em vias de sinalização associadas ao reconhecimento de dano celular visando reduzir a imunopatologia das formas graves de tuberculose. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A morte celular necrótica é um processo celular inflamatório, em virtude da grande quantidade de sinais de dano celular liberados. Durante a tuberculose primária progressiva é observada extensa lesão necrótica nos pulmões e disseminação do bacilo para outros órgãos. Em estudo prévio, utilizando a infecção de camundongos C57BL/6 com isolados clínicos micobacterianos, observamos que isolados hipervirulentos induzem formas graves da doença caracterizadas por necrose pulmonar, pneumonia, disseminação bacilar e, em alguns casos, produção ineficientes de mediadores inflamatórios. Neste presente estudo, nós hipotetizamos que a amplificação da necrose pulmonar, via reconhecimento de sinais de dano celular pelo receptor purinérgico P2X7 (P2X7R), poderia favorecer a progressão da doença, bem como a potencialização da resposta inflamatória. Para investigar se a resposta do sistema imune inato ao sinal de dano poderia contribuir para o desenvolvimento de lesões necróticas nas formas graves de tuberculose, nós examinamos a progressão da doença em camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} infectados com cepas micobacterianas hipervirulentas. Verificamos que o reconhecimento de extracelular ATP (eATP) via P2X7R é de suma importância para o desenvolvimento da doença grave, estando a doença atenuada em camundongos P2X7R^{-/-}. Resultados *in vitro* mostraram que bactérias hipervirulentas apresentam maior crescimento dentro dos macrófagos e foram capazes de induzir morte celular dependente da ativação do P2X7R, o que favoreceu ao escape de bactérias viáveis, bem como sua resistência ao mecanismo protetor induzido nos macrófagos após estímulo com eATP. Além disso, vimos que as micobactérias da cepa H37Rv induzem ativação do inflamassoma NLRP3 por facilitar a liberação de catepsina B dos lisossomas para o citosol, sendo este processo dependente da proteína ESAT-6 de Mtb. A presença da ESAT-6 no citosol incrementou a produção de IL-1 β induzida após o estímulo com eATP via P2X7R. Observamos ainda que a liberação de eATP não parece apenas induzir a necrose dos macrófagos infectados, mas impactou também na ativação da resposta imune adquirida. As células T CD4⁺ específicas para ESAT-6, presentes majoritariamente no parênquima pulmonar dos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa hipervirulenta MP287/03, apresentaram baixa ativação celular quando a necrose pulmonar estava exacerbada. Estas células mostraram aumento da expressão das ecto-nucleotidases CD39 e CD73, capazes de hidrolisar o eATP e gerar adenosina. A administração de cafeína, um inibidor dos receptores de adenosina, aos camundongos infectados com a cepa MP287/03 levou ao aumento da ativação da resposta imune, marcado por intensa ativação das células T CD4⁺ parenquimais e produção de IFN γ nos pulmões. Baseado nestes achados, nós propomos que o rápido crescimento intracelular das micobactérias hipervirulentas resulta numa massiva destruição dos macrófagos. O ATP liberado é reconhecido pelo P2X7R acelerando a morte necrótica dos macrófagos infectados e disseminação de bacilos viáveis. Ainda, parte deste eATP poderia ser degradado gerando adenosina, que por sua vez inibiria a ativação das células T CD4⁺. Este círculo vicioso favorece a exacerbção da pneumonia, necrose pulmonar e disseminação do bacilo. Nosso estudo provê uma nova perspectiva para

o desenvolvimento de protocolos terapêuticos baseados na inibição do P2X7R e dos receptores de adenosina para melhorar o prognóstico de formas graves da doença.

Palavras-chave: Tuberculose. Necrose. P2X7R. ATP. Adenosina. Inflamassoma.

ABSTRACT

Amaral EP. Intervention in signaling pathways associated with cellular damage recognition to reduce the immunopathology of severe forms of tuberculosis. [Ph.D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Necrotic cell death is an inflammatory process due to the large amount of damage signals released. During progressive primary tuberculosis, extensive necrotic lesions in the lungs and bacterial dissemination are both observed. In a previous study, by using a pulmonary murine infection with mycobacterial clinical isolates, we observed that hypervirulent strains induced aggressive forms of tuberculosis characterized by pulmonary necrosis, pneumonia, bacterial spread and, in some cases, inefficient production of inflammatory mediators. Herein, we hypothesized that the amplification of pulmonary necrosis through damage signal recognition by a purinergic receptor named P2X7 receptor (P2X7R) could favor progression of the disease, as well as increase of inflammatory response. To investigate whether the innate immune response to damage signals could contribute to the development of necrotic lesions during aggressive forms of tuberculosis, we examined disease progression in C57BL/6 and P2X7R^{-/-} mice infected with hypervirulent mycobacterial strains. We found that recognition of extracellular ATP (eATP) through P2X7R is crucial to the outcome of severe tuberculosis, being the disease attenuated in P2X7R^{-/-} mice. *In vitro* experiments showed that hypervirulent strains are able to grow rapidly inside macrophages and induce necrotic cell death by a P2X7R-dependent mechanism. This process favored the escape of viable bacteria, which resisted to the protective mechanisms elicited in macrophages following eATP stimulation. Furthermore, we observed that H37Rv strain induce NLRP3 inflammasome activation by facilitating the release of cathepsin B from the lysosomes to the cytosol, being this process dependent of Mtb ESAT-6. Cytosolic ESAT-6 augmented the IL-1 β production following eATP stimulation through P2X7R. We also observed that ATP release does not seem only affect the induction of necrosis in infected macrophages, but also impacted the acquired immune response activation. Mtb-specific CD4⁺ T cells, mainly present in the parenchymal lungs from C57BL/6 infected with hypervirulent MP287/03 strain, showed low cellular activation, when pulmonary necrosis was found exacerbated. These cells showed increased levels of ecto-nucleotidases such as CD39 and CD73, which could hydrolyze eATP and generate adenosine. Caffeine administration, an inhibitor of adenosine receptors, to mice infected with hypervirulent MP287/03 strain led to augment of immune response activation characterized by enhanced activation of lung parenchymal CD4⁺ T cells and IFN γ production in the lungs. Based on these findings, we propose that the rapid intracellular growth of hypervirulent mycobacteria results in massive macrophage damage. The ATP released by damaged cells engages P2X7R and accelerates the necrotic death of infected macrophages and the release of bacilli. Furthermore, eATP could be degraded generating adenosine, which could inhibit lung parenchymal CD4⁺ T cells. This vicious cycle exacerbates pneumonia and lung necrosis by promoting widespread cell destruction and bacillus dissemination. Our study provides a new perspective to the development of therapeutic protocols based on the inhibition of P2X7R and adenosine receptors to improve the prognostic of aggressive forms of tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis. Necrosis. P2X7R. ATP. Adenosine. Inflammasome.

1.1 Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por bacilos álcool-ácido resistentes e pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A infecção micobacteriana comumente é estabelecida nos pulmões, podendo também acometer outros órgãos do corpo (Sundaramurthy, Pieters, 2007). Apesar do avanço dos programas de controle da tuberculose, este mal permanece como um grande problema de saúde pública, principalmente, em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento (World Health Organization, 2014).

Indivíduos infectados na fase bacilífera (fase infecciosa) são potenciais transmissores da doença. A disseminação da tuberculose ocorre mais comumente à partir de aerossóis produzidos por indivíduos infectados no ato da tosse, fala e espirro. As gotículas de aerossol, contendo partículas bacilíferas, são inaladas por indivíduos saudáveis e, desta forma, os bacilos alojam-se nos alvéolos pulmonares (Center for Diseases Control and Prevention, 2008). Com a doença instalada o indivíduo portador é capaz de contaminar terceiros. Em grande parte dos casos o estado de infecção latente, comumente conhecido como tuberculose latente, é caracterizado pela ausência de sinais clínicos. Entretanto, os bacilos podem manter-se vivos dentro de calcificações ou regiões granulomatosas decorrentes da infecção primária. Em virtude da baixa disponibilidade de oxigênio nestas regiões, os bacilos mantêm sua taxa metabólica baixa, apresentando, portanto, uma característica de persistência não replicadora (Flynn, Chan, 2001). Este período pode perdurar por anos, podendo ocorrer reativação da infecção primária, uma vez que o indivíduo infectado apresente um quadro clínico de queda da vigilância imunológica.

Estudos sugerem que a infecção micobacteriana emergiu na África há aproximadamente 35.000 anos atrás (Hughes et al., 2002; Sreevatsan et al., 1997), mas outros estudos especulam que a origem da tuberculose pode ser mais antiga que outras doenças como febre tifóide e malária, podendo ser datada de 3 milhões de anos atrás (Gutierrez et al., 2005). No passado, houve uma rápida disseminação da tuberculose devido à alta taxa migratória. Naquele momento os tratamentos eram desempenhados de forma precária, o que elevou a taxa de mortalidade. Com o desenvolvimento da pasteurização do leite, e logo com o advento dos quimioterápicos tais como estreptomicina (década de 1940), pirazinamida (1952), isoniazida (1952), etambutol (1961), e rifampicina (1966), houve grande expectativa

em torno da cura da tuberculose e esperança em sua erradicação. Porém, devido a fatores externos como, por exemplo, a pobreza, a doença continuou a se propagar dentre os indivíduos (Sepkowitz et al., 1995). Tal situação agravou-se com o aparecimento de bacilos resistentes aos quimioterápicos habituais, fruto, na maioria das vezes, de tratamentos irregulares com grandes percentuais de abandono (WHO, 2014).

Os sintomas mais frequentes da tuberculose são: febre, sudorese noturna, falta de apetite, emagrecimento acentuado, ocorrência de dor torácica e tosse seca por mais de 3 semanas, sendo esta contínua e seca no início, seguido por expectoração de muco (escarro), com a presença de sangue nos casos mais graves (CDC, 2014).

A prevenção contra a tuberculose no Brasil é feita na infância com inoculação da vacina BCG (Bacilo Calmette Guérin), desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin. Esta vacina consiste de cultura de bacilos vivos atenuados, numa concentração pré-determinada, que devido à sua capacidade imunogênica preservada, induz uma resposta imune protetora. Entretanto, em indivíduos imunocomprometidos esta vacina pode desencadear um processo infeccioso, culminando no desenvolvimento da doença (Khan et al., 2015; van den Berg et al., 2009).

Diversos fatores colaboram para diminuição da eficácia da vacina BCG como, por exemplo, a diversidade gênica das populações vacinadas e a qualidade das cepas de BCG. Embora a vacina BCG previna o desenvolvimento das formas disseminadas da tuberculose em jovens, ela não protege os indivíduos adultos contra a forma pulmonar da doença, bem como contra reinfecções (Kaufmann, 2001).

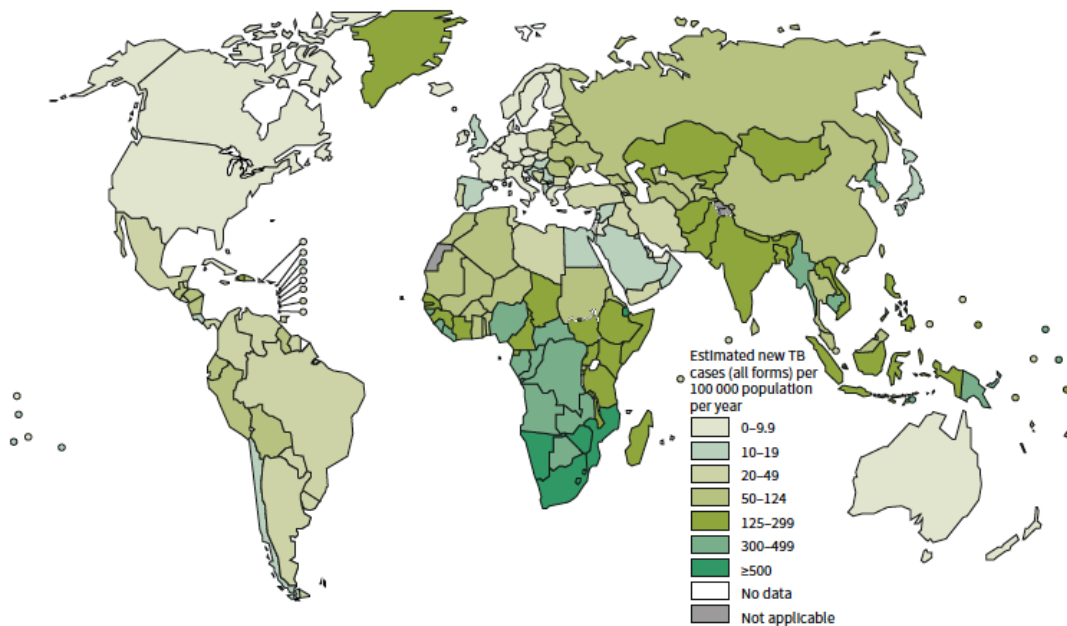
1.1.1 Aspectos epidemiológicos da tuberculose

A tuberculose é uma doença que está diretamente ligada a fatores socioeconômicos, sendo de alta prevalência em países pobres e/ou populosos. Entre os países com maior incidência da doença estão a Índia, China, Nigéria, Paquistão, Indonésia, África do Sul, Bangladesh, Filipinas, República Dominicana do Congo, Etiópia, Rússia e Brasil (WHO, 2014).

Estima-se que um terço da população mundial está infectado pelo bacilo Mtb,

mas somente 10% destes indivíduos desenvolvem a doença (Kaufmann, 2001). A partir dos anos 80, o crescimento dos casos de tuberculose decorre, em grande parte, devido ao aumento dos casos de AIDS (do inglês, *acquired immunodeficiency disease syndrome*), mal esse que compromete o sistema imune e favorece o estabelecimento de várias doenças infecciosas, incluindo a tuberculose. Assim, a incidência de novos casos de tuberculose atingiu aproximadamente 9 milhões em 2013 (**Figura 1**), e 1,5 milhões de mortes (incluindo 360.000 mortes dentre indivíduos positivos para HIV (do inglês, *human immunodeficiency virus*)) (WHO, 2014). Embora uma redução no número de casos de tuberculose tenha sido registrada nas últimas décadas, no ano passado foi reportado um aumento de 400.000 novos casos de tuberculose e 200.000 mortes em relação ao ano anterior. Um importante fator a ser ressaltado é o aparecimento de cepas resistentes ao tratamento pelos quimioterápicos de primeira linha (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol), denominadas cepas MDR-TB (do inglês, *multidrug-resistant tuberculosis*). As cepas MDR-TB foram responsáveis por 480.000 infecções registradas em 2013 e, ainda, por 210.000 mortes reportadas no mesmo ano (WHO, 2014). Recentemente, casos de tuberculose desencadeados por bacilos resistentes à segunda linha de quimioterápicos (capreomicina, canamicina, amicacina e fluoroquinolona), denominados XDR-TB (do inglês, *extensively drug-resistant tuberculosis*) vêm sendo registrados. Foi estimado que cerca de 9% dos casos decorrentes de infecções por cepas MDR-TB tenham sido, na verdade, desencadeados por cepas XDR-TB (WHO, 2014).

Figura 1 - Estimativa das taxas de incidência de tuberculose em 2013.



Fonte: WHO, 2014

O Brasil ocupa a 17^o posição em número de notificações da doença no mundo, perfazendo um coeficiente de incidência de 33,8 novos casos/100.000 habitantes em 2013, sendo que 7 a 10% dos doentes não respondem aos medicamentos utilizados no tratamento contra tuberculose (Corbett et al., 2003; Ministério da Saúde, 2015).

1.2 Gênero *Mycobacterium* e virulência micobacteriana

O gênero *Mycobacterium* é composto por bactérias na forma de bacilo, não-esporulantes, álcool-ácido resistentes e imóveis, apesar de relatada mobilidade para as espécies *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium avium* (Barrera, 2007). A riqueza de lipídeos na parede celular torna essas bactérias hidrofóbicas, além de ser responsável por muitas das características desse gênero como, por exemplo, antigenicidade, crescimento lento, resistência às colorações laboratoriais simples, bem como ao álcool, ácidos, detergentes e antibióticos comuns. Em condições favoráveis, o Mtb divide-se a cada 12-16 horas, o que explica o fato do desenvolvimento de doença crônica (Kaufmann, Andersen, 1998).

O gênero *Mycobacterium* é composto por dois grandes complexos denominados complexo Mtb e complexo *M. avium*. O complexo Mtb é constituído de várias espécies, dentre elas, Mtb, *M. bovis* (Mbv), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium prinnipedii* e *Mycobacterium microti*. A tabela 1 mostra a classificação taxonômica do gênero *Mycobacterium*.

Tabela 1 - Classificação taxonômica dos complexos Mtb e *M. avium*.

Reino	Bactéria	
Filo	Actinobacteria	
Classe	Actinobacteria	
Subclasse	Actinobacteridae	
Ordem	Actinomycetales	
Subordem	Corynobacterineae	
Família	Mycobacteriaceae	
Gênero	<i>Mycobacterium</i>	
Espécies	<i>M. tuberculosis</i>	} Complexo <i>M. tuberculosis</i>
	<i>M. bovis</i>	
	<i>M. africanum</i>	
	<i>M. Canetti</i>	
	<i>M. caprae</i>	
	<i>M. prinnipedii</i>	
	<i>M. microti</i>	
	<i>M. avium-avium</i>	} Complexo <i>M. avium (MAC)</i>
	<i>M. avium-intracellulare</i>	
	<i>M. avium-paratuberculose</i>	
	<i>M. avium-silvaticum</i>	

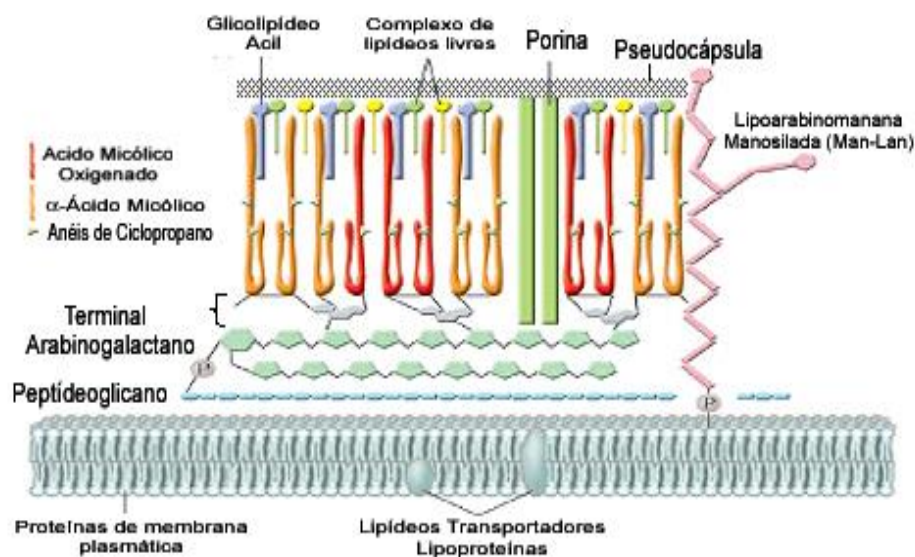
Fonte: Baseado em Barrera (2007)

O Mbv e o Mtb, por exemplo, possuem 99,95% de identidade genômica à nível de nucleotídeo (Garnier et al., 2003). Apesar das semelhanças, estas duas espécies mostram consideráveis diferenças em suas propriedades biológicas, que conferem ampla adaptação ao hospedeiro. O Mtb tem como hospedeiro natural o humano, já o Mbv, além dos humanos, possui como reservatórios os animais

silvestres e domésticos (Matthias, 1998). Outra diferença é a forma de transmissão, onde o Mtb é transmitido principalmente por aerossol, enquanto o Mbv pode ser transmitido por produtos derivados de animais, além da via por aerossol (Ayele et al., 2004). Os sintomas produzidos em humanos infectados com Mbv são clinicamente indistinguíveis dos induzidos por Mtb (Okafor et al., 2011).

As micobactérias apresentam seu envelope celular composto por uma membrana plasmática, uma parede celular e uma camada externa semelhante à cápsula não aderida. A parede celular é típica de uma bactéria gram-positiva, composta por uma camada interna de peptidoglicanos (PGN), conferindo forma e integridade estrutural à bactéria. Esta camada de PGN encontra-se covalentemente ligada a um polissacarídeo ramificado, a arabinogalactana, esterificadas em sua porção externa com ácidos graxos de alto peso molecular, os ácidos micólicos. A camada externa é recoberta por lipídeos livres, como pitioglicerol dimicoserato (PDIM), glicolipídeos fenólicos (PGL), polipeptídeos e lipoproteínas (Barrera, 2007). Outros lipídeos e glicolipídeos estão associados de forma não covalente à parede celular da micobactéria, sendo muitos destes potentes moduladores das funções dos macrófagos e células dendríticas (DCs) como, por exemplo, o lipoarabinomanana (LAM). O complexo Mtb apresenta alteração na molécula de LAM, estando esta manosilada e, agora, denominada Man-LAM (do inglês, *mannosylated lipoarabinomannan*) (Figura 2) (Glickman, Jacobs, 2001).

Figura 2 - Representação do envelope celular de Mtb.



Fonte: Baseado em Riley (2006) (Riley, 2006).

Fatores associados à virulência do patógeno são de extrema importância para a persistência do microrganismo no hospedeiro, conferindo-lhe capacidade de evadir do sistema imune e proliferar (Kaufmann, 2001). Tais fatores, principalmente envolvidos em mecanismos de reprogramação transcricional, baixo metabolismo catalítico e capacidade imunomoduladora são responsáveis pelo sucesso do Mtb como agente parasita (Sachdeva et al., 2010). O sequenciamento completo do cromossomo circular da cepa H37Rv de Mtb em 1998 por Cole e colaboradores (1998), foi de suma importância para auxiliar a compreensão acerca da patogenia induzida pelo complexo Mtb (Cole, Barrell, 1998; Cole et al., 1998).

A identificação de genes envolvidos na regulação da virulência micobacteriana se faz importante para o entendimento de mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da doença, bem como para a elaboração de novos quimioterápicos. O termo virulência é uma forma de medir o quão patogênico é um microrganismo. Os parâmetros utilizados para quantificar a virulência de um patógeno são: número de organismos necessários para estabelecer uma infecção, taxa de crescimento bacteriano, taxa de disseminação do patógeno, persistência crônica no hospedeiro, taxa de transmissibilidade, indução de lesão tecidual, taxa de progressão da doença, bem como a frequência de sobrevivência do hospedeiro (Cosma et al., 2003).

A regulação da expressão gênica é crucial para determinar a manutenção da virulência micobacteriana. A expressão gênica nas micobactérias é regulada, primariamente, à nível de iniciação transcricional, por holoenzimas *RNA polimerase* (Sachdeva et al., 2010). Esta holoenzima é formada por 5 subunidades fixas e 1 subunidade dissociável, denominada subunidade sigma (σ). Foi descrito que a expressão diferencial e temporal de reguladores, que são controlados pela indução de um ou mais fatores σ , permite ao Mtb manter-se por múltiplos estágios de interação com o hospedeiro, incluindo adesão, invasão, replicação intracelular e disseminação para outros órgãos (Smith, 2003).

A RD-1 (do inglês, *region of difference -1*) é uma região do genoma micobacteriano responsável por codificar fatores associados à virulência micobacteriana (Guinn et al., 2004). Esta região é responsável por codificar, por exemplo, as proteínas ESAT-6 (do inglês, *6 kDa early secretory antigenic target*) e CFP-10 (do inglês, *10-kDa culture filtrate protein*), consideradas de alta imunogenicidade (Ganguly et al., 2008). Foi observado que a cepa BCG não possuía

a região RD-1, enquanto as cepas virulentas possuem. A inserção da região RD-1 no genoma da BCG foi responsável pelo restabelecimento da virulência desta cepa. Por outro lado, a eliminação da região RD-1 na cepa virulenta H37Rv, resultou na redução do crescimento intracelular do bacilo em macrófagos humanos e induziu baixo crescimento bacilar nos pulmões, lesão pulmonar branda e baixa mortalidade dos animais infectados (Guinn et al., 2004; Junqueira-Kipnis et al., 2006; Lewis et al., 2003; Pym et al., 2002; Sherman et al., 2004).

Diversos estudos acerca do papel destas proteínas foram realizados. Por exemplo, foi descrito que a CFP-10 é capaz de diminuir a produção de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) nos macrófagos, o que leva ao aumento da atividade de fosfatases, tais como SHP-1 (do inglês, *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*) e SHP-2 (do inglês, *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*), culminando na desfosforilação de proteases ativas (Ganguly et al., 2008). Já o reconhecimento da proteína ESAT-6, pelo receptor TLR-2 (do inglês, *toll-like receptor-2*) na superfície dos macrófagos, inibe a ativação de fatores de transcrição regulados por interferon-gama (IFN γ) e NF- κ B (do inglês, *nuclear factor κ B*) (Ganguly et al., 2008). Recentemente, foi descrito que a ESAT-6 é capaz de formar poros na membrana da célula infectada, além de induzir a ativação de sinais pró-inflamatórios via secreção de IL-1 β , como consequência da ativação do complexo inflamassoma NLRP3 (do inglês, *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) (Mishra et al., 2010; Wong, Jacobs, 2011). A produção de IL-1 β , por sua vez, é capaz de induzir a maturação do fagossoma (Mishra et al., 2010), porém o recrutamento da proteína coronina-1, induzido pelo patógeno, leva à inibição da fusão do endossoma com o lisossoma, sendo este um importante mecanismo de escape do patógeno (Jayachandran et al., 2008; Jayachandran et al., 2007; Pieters, 2001). Devido à formação de poros na membrana celular, a ESAT-6 facilita a translocação da micobactéria do endossoma para o citosol, sendo, portanto, mais um mecanismo de escape do patógeno à resposta microbicida induzida pelo macrófago (Simeone et al., 2012; van der Wel et al., 2007).

Fatores lipídicos micobacterianos também são responsáveis pelo aumento da virulência dos bacilos. Tem sido descrito que lipídios expressos na superfície das micobactérias são responsáveis por modular a resposta imune. A adição de LAM na cultura de macrófagos murinos induz o bloqueio da expressão de genes induzidos por IFN γ (Chan et al., 1991). O Man-LAM de Mtb parece inibir a maturação

fagossomal (Fratti et al., 2001; Fratti et al., 2003). Ainda, a liberação de LAM dentro dos fagossomas permite sua incorporação em várias endomembranas do macrófago infectado (Ullrich et al., 2000), o que é essencial para o bloqueio da maturação dos endossomas (Welin et al., 2008).

Modelos experimentais de infecção micobacteriana *in vitro* e *in vivo* vêm sendo utilizados para determinar o impacto destes fatores de virulência na patogenia da tuberculose. Muitas variações à nível de virulência têm sido observadas em isolados clínicos de Mtb e Mbv. Em infecção de camundongos com isolados clínicos de Mtb, de diferentes genótipos, foi observado que o genótipo *Beijing* apresenta alta virulência, sendo verificado maior contagem de bacilos no pulmão, ampla lesão tecidual e baixa sobrevivência dos animais infectados (Dormans et al., 2004; Ribeiro et al., 2014). Entretanto, Lasunskaja e colaboradores (2010) mostraram que existem diferenças entre cepas pertencentes ao genótipo *Beijing* isolados de pacientes na Rússia e Brasil durante infecção de macrófagos *in vitro*. Neste estudo, foi observado que as cepas que circulam na Rússia apresentam genótipo moderno, enquanto as cepas circulantes no Brasil mostraram genótipo ancestral. Basicamente, a diferença entre o genótipo moderno e ancestral seria importante para definir a virulência do patógeno, sendo observada maior virulência nas cepas de genótipo moderno do que nas cepas de genótipo ancestral (Lasunskaja et al., 2010; Ribeiro et al., 2014). Acredita-se que a emergência, persistência e o aumento da virulência do genótipo *Beijing* possam ser atribuídos à seleção natural das cepas, possivelmente, devido à vacinação com BCG, tratamento com quimioterápicos e alta frequência mutacional (Parwati et al., 2010).

1.3 Resposta imune contra micobactérias

Após a infecção, o bacilo pode ser eliminado, entrar em estado de latência, ou ainda desencadear uma infecção disseminada. Este quadro pode evoluir para uma doença aguda, podendo levar o indivíduo à morte. A infecção ocorre principalmente através da inalação de partículas de aerossol contendo o bacilo. Chegando ao interior dos pulmões, os bacilos alojam-se no trato respiratório, onde entram em contato com as células residentes, infectando os macrófagos alveolares, DCs e macrófagos intersticiais (Kaufmann, 2001; Ottenhoff, Kaufmann, 2012).

Células inflamatórias são recrutadas para os pulmões durante a fase inicial da

infecção e, em muitos casos, promovem o controle da infecção. A infecção micobacteriana, comumente, evolui como uma infecção latente, em que o “equilíbrio” entre o bacilo e o hospedeiro é garantido pela formação do granuloma. A ativação da resposta imune do hospedeiro auxilia no controle da proliferação micobacteriana, mas alguns bacilos podem evadir a estes mecanismos de eliminação e sobreviver dentro de regiões de necrose intragranulomatosa, resultantes da morte de macrófagos. Uma vez que o indivíduo portador de infecção latente sofra queda da vigilância imunológica ocorre reativação da infecção, seguida de proliferação e disseminação dos bacilos (Alcais et al., 2010; Keane et al., 2001; van Crevel et al., 2002). O desenvolvimento da doença ativa é observado após o desenvolvimento da AIDS (Kaufmann, 2001; Ottenhoff, Kaufmann, 2012) ou durante terapias com anti-TNF- α e/ou bloqueadores de IL-12/IL-23 (Keane et al., 2001; Ottenhoff, Kaufmann, 2012).

1.3.1 Reconhecimento micobacteriano por receptores celulares do sistema imune inato

Os macrófagos possuem um ciclo vital longo, o que permite a ocorrência de muitas fases de replicação intracelular do bacilo (Clemens, 1996). O reconhecimento das micobactérias pelo sistema imune inato é mediado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs; do inglês, *pattern-recognition receptors*), incluindo os receptores do tipo Toll (TLR)-2, TLR-4, TLR-8 e TLR-9 (Bafica et al., 2005a; Holscher et al., 2008; Mortaz et al., 2014); receptores do tipo lectina C (CLRs), tais como dectina-1, receptor de manose (MR; do inglês, *mannose receptor*) e molécula de adesão intercelular de DC (DC-SIGN; do inglês, *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*); receptores do tipo NOD (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*) (Divangahi et al., 2008; Kaufmann, 2001; Tanne, Neyrolles, 2011); e o receptor STING (do inglês, *stimulator of interferon genes*) (Barber, 2011; Manzanillo et al., 2012). Além disso, os receptores de complemento (CR), receptores Fc e receptores *scavenger* são também implicados no reconhecimento micobacteriano e endocitose dos bacilos (O'Garra et al., 2013). Mutações gênicas responsáveis por imunodeficiências associadas aos PRRs ou moléculas que são necessárias na cascata de sinalização inicializadas por estes receptores, geralmente, aumentam a gravidade da tuberculose em humanos,

um fenômeno também observado em modelos murinos geneticamente modificados como, por exemplo, os modelos experimentais que utilizam camundongos *Knockouts* (Kaufmann, 2001; O'Garra et al., 2013). Dentre os TLRs, o TLR-2 tem papel fundamental no reconhecimento micobacteriano pelo sistema imune inato. O TLR-2 pode formar heterodímeros com ambos, TLR-1 e TLR-6, sendo estes receptores expressos na membrana plasmática de macrófagos, neutrófilos, DCs e linfócitos. Camundongos deficientes em TLR-2 são suscetíveis à infecção por micobactérias e apresentam aumento da resposta inflamatória pulmonar (Bafica et al., 2005a; Drennan et al., 2004). O TLR-2 reconhece glicolípídeos micobacterianos, tais como LAM, Man-LAM, lipomanano (LM), glicoproteína de 19-kDa (também conhecida como LpQH ou lipoproteína de 19-kDa), fosfatidilinositol manosilada (PIM), lipoproteína triacilada e diacilada, e a proteína ESAT-6 (Lopez et al., 2003; Mortaz et al., 2014). O TLR-4 também reconhece antígenos micobacterianos, tais como as HSP (do inglês, *heat-shock protein*) (Bulut et al., 2005), a proteína ribossomal MT 50S (Kim et al., 2012) e a glicoproteína 38-kDa (Jung et al., 2006). O TLR-9 é encontrado em endossomos e fagossomos, onde ele reconhece DNA micobacteriano após a endocitose do bacilo (Bafica et al., 2005a). A ativação do macrófago via sinalização por TLR-2, TLR-4 e TLR-9 requer a participação de uma molécula adaptadora denominada MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response gene 88*). Hölscher e colaboradores (2009) mostraram que camundongos deficientes em MyD88 são altamente suscetíveis à infecção por Mtb, exibindo maior vulnerabilidade à infecção do que camundongos TLR-2/-4/-9^{-/-}. Estes resultados sugerem a grande importância da sinalização mediada pela molécula MyD88 para a defesa do hospedeiro, indicando um papel adicional do MyD88, além de sua participação na sinalização via TLR-2, TLR-4 e TLR-9 (Holscher et al., 2008).

Os NLRs são PRRs citosólicos que reconhecem componentes micobacterianos intracelulares e medeiam a ativação dos macrófagos independente da sinalização via TLR (Delbridge, O'Riordan, 2007). Os NLRs apresentam como "base" de sua estrutura um domínio de ligação de nucleotídeo (do inglês, *nucleotide-binding domain*) chamado NACHT (NAIP (do inglês, *neuronal apoptosis inhibitor protein*), CIITA (do inglês, *MHC class 2 transcription activator*), HET-E (do inglês, *incompatibility locus protein from Podospora anserina*) e TP-1 (do inglês, *telomerase-associated protein*)) ou NOD. Os NLRs são divididos em 4 subfamílias baseados em sua porção N-terminal: NLRA (do inglês, *NLR- acidic transactivating domain*), NLRB

(do inglês, *NLR-BIR- Baculovirus inhibitor of apoptosis (IAP)-like repeat – domain*), NLRC (do inglês, *NLR-caspase activation and recruitment domain*) e NLRP (do inglês, *NLR-pyrin domain*). Dentre os NLRCs, NOD-1 e NOD-2 reconhecem PGN oriundos da parede celular micobacteriana. Além disso, NOD-2 é um sensor intracelular de muramil dipeptídeo (MDP) que é encontrado em *Streptococcus pneumoniae* e Mtb (Chen et al., 2009). NOD-1 e NOD-2 induzem a ativação da proteína quinase RIPK-2 (do inglês, *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase -2*) e a translocação NF- κ B, culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , fundamentais para a resistência do hospedeiro à infecção (Ferwerda et al., 2005). O NLRP3 é outra proteína pertencente à família dos NLRs que sente a presença intracelular de Mtb (Mishra et al., 2010), culminando na liberação de IL-1 β bioativa (Kayagaki et al., 2011; Lamkanfi, Dixit, 2014; Mishra et al., 2010; Wong, Jacobs, 2011). Durante a infecção por Mtb *in vitro*, a IL-1 β é sintetizada como uma pró-citocina, sendo, mais tarde, clivada por um processo enzimático mediado pela ativação do inflamassoma NLRP3 (Mishra et al., 2010). O complexo inflamassoma NLRP3 é formada pela molécula NLRP3 ligada à uma proteína adaptadora chamada ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-like*), que contém em sua estrutura um domínio de ativação e recrutamento de caspase, chamado domínio CARD (do inglês, *caspase activation and recruitment domain*). A interação entre o domínio CARD da molécula ASC e o domínio CARD da pró-caspase-1 facilita a ativação da caspase-1, o que leva à clivagem da pró-IL-1 β e, conseqüentemente, geração da IL-1 β madura. A ativação da caspase-1 é aumentada com a formação de uma estrutura perinuclear denominada *speck* de ASC, que é composta por várias moléculas de ASC e caspase-1, ligadas a um único complexo do inflamassoma NLRP3 (Franklin et al., 2014).

A geração de IL-1 β madura em macrófagos infectados por micobactérias depende da produção de ROS e da ativação de catepsinas lisossomais (Chen et al., 2012). Além disso, a ESAT-6 parece ser o principal antígeno micobacteriano capaz de estimular a liberação de IL-1 β madura, dependente da ativação do inflamassoma NLRP3 (Mishra et al., 2010). Entretanto, ainda não está claro como o inflamassoma NLRP3 é ativado durante a infecção micobacteriana. Um das hipóteses seria o reconhecimento direto da proteína ESAT-6 pelo NLRP3. Porém, a interação direta do NLRP3 com componentes de origem bacteriana ainda não foi mostrada. Outra

hipótese seria o *sensing* da perturbação citosólica causada pela ESAT-6. Isto porque, tem sido descrito que esta proteína facilita o escape da micobactéria do fagossoma para o citosol por mediar a formação de um poro na membrana do fagolisossoma (Simeone et al., 2012). Desta forma, é possível especular que a formação do poro mediado pela ESAT-6 resulte numa perturbação citosólica, que por sua vez é necessária para a geração de ROS, efluxo de K^+ e desestabilização lisossomal (Abdalla et al., 2012; Welin et al., 2011; Wong, Jacobs, 2011).

A secreção de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-12, TNF- α e GM-CSF (do inglês, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), bem como as quimíoninas IL-8 e RANTES (do inglês, *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*), é uma das várias consequências da ativação dos macrófagos após o reconhecimento do bacilo. Além disso, os macrófagos secretam fatores microbicidas, tais como intermediários reativos de oxigênio (ROI, do inglês, *reactive oxygen intermediate*) e intermediários reativos de nitrogênio (RNI, do inglês, *reactive nitrogen intermediate*), que são fundamentais para eliminar do patógeno (Kaufmann, 2001).

Por outro lado, para sua sobrevivência nos macrófagos, os bacilos modificam a composição do fagossoma quanto à sua interação com outras organelas da célula hospedeira. O bloqueio da maturação do fagossoma, ao longo da via endossomal-lisossoma, ocorre a fim de evitar a fusão do fagossoma com o lisossoma, residindo o bacilo, portanto, num compartimento com as características de um endossoma. Estas modificações estão associadas com alterações na expressão de proteínas presentes no fagossoma, incluindo alterações na composição da Rab GTPase, exclusão da próton ATPase vacuolar, com consequente falta de acidificação fagossomal, e retenção da proteína coronina-1 (também denominada TACO) na superfície do fagossoma (Glickman, Jacobs, 2001; Jayachandran et al., 2008; Jayachandran et al., 2007; Pieters, 2001; Sturgill-Koszycki et al., 1994).

1.3.2 Ativação da resposta imune adquirida

As DCs, assim como os macrófagos, servem como uma ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (Smith, 2003). As DCs são as primeiras células a apresentarem antígeno micobacterianos aos linfócitos T, após migrarem para o linfonodo mediastinal, cerca de 8-12 dias depois da infecção primária

(Steinman, 2012). Nos pulmões, estas células reconhecem as micobactérias via receptores de lectina tipo-C e DC-SIGN, internalizam, processam e apresentam os antígenos protéicos via moléculas de classe II do MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*) ou antígenos não-protéicos via moléculas CD1, para células T CD4⁺ e NK-T, respectivamente (Guenin-Mace et al., 2009). Antígenos micobacterianos localizados no citosol celular podem também ser apresentados para os linfócitos T CD8⁺ via moléculas de classe I do MHC. Após o reconhecimento do bacilo, as DCs se desprendem do tecido pulmonar e migram para os linfonodos, onde sofrem maturação celular e passam a expressar em sua superfície moléculas co-estimulatórias (B7.1/CD80 e B7.2/CD86), que promoverão o segundo sinal para a ativação das células T.

A população de células T CD4⁺ se divide em diferentes subpopulações de acordo com sua ativação e diferenciação. As células T CD4⁺ Th1 (do inglês, *T helper 1*) são capazes de produzir grandes quantidade de IFN γ , uma citocina que ativa os macrófagos e promove a resposta microbicida, além de induzir a resposta granulomatosa (Flynn et al., 1993; Orme, 1987; Orme et al., 1992). Indivíduos deficientes em linfócitos T CD4⁺ devido à infecção com HIV, camundongos e primatas não humanos depletados de células T CD4⁺ (Flynn, Chan, 2001; Lin et al., 2012; Pawlowski et al., 2012), humanos com deficiências gênicas envolvendo a sinalização por IFN γ e camundongos deficientes em IFN γ ou Tbet (fator de transcrição responsável pela diferenciação da população de linfócitos Th1) são extremamente suscetíveis à infecção por Mtb (Filipe-Santos et al., 2006; North, Jung, 2004; Sullivan et al., 2005). Estas observações sugerem que a resposta efetora das células TCD4⁺, polarizada para o perfil Th1 possua um papel central na resistência do hospedeiro à infecção micobacteriana. Recentemente, um estudo acerca da ativação das células T CD4⁺ presentes na vasculatura e parênquima pulmonar mostrou que as células T CD4⁺ específicas para antígeno de Mtb entram rapidamente no parênquima pulmonar e desempenham um papel protetor. Ainda neste estudo, foi mostrado que a transferência adotiva de células T CD4⁺ presentes originalmente no parênquima pulmonar apresenta maior capacidade de controlar a infecção do que a transferência de células T CD4⁺ oriundas da vasculatura pulmonar, mesmo esta última população sendo capaz de secretar altos níveis de IFN γ (Sakai et al., 2014a). Assim, o controle da infecção correlaciona com a habilidade da célula T CD4⁺ entrar de forma eficiente no tecido pulmonar, ao invés de produzir somente

altos níveis de IFN γ , sugerindo que o controle da infecção por Mtb possa ser mediada por outro mecanismo independente da alta produção de IFN γ (Sakai et al., 2014b).

A subpopulação de células Th17 vem ganhando importância no estudo acerca da ativação da resposta imune contra micobactérias. Esta subpopulação é capaz de secretar IL-17 e quimiocinas KC/CXCL1 (do inglês, *keratinocyte chemoattractant*), e MIP-2/CXCL2 (do inglês, *macrophage inflammatory protein 2*), que participam do recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção (Khader, Cooper, 2008). A IL-17 parece atuar na formação dos granulomas em resposta à infecção por *M. bovis* BCG e durante infecção por cepas hipervirulentas (Gopal et al., 2014; Okamoto Yoshida et al., 2010; Umemura et al., 2007), facilitando a resistência do hospedeiro ao Mtb. Monin e colaboradores (2015) mostraram que a transferência adotiva de células T CD4⁺ Th17, específicas para antígenos de Mtb, para camundongos naïve antes da infecção resulta na proteção do hospedeiro a níveis similares aos observados em estratégias de vacinação (Monin et al., 2015). Isto sugere, que a subpopulação de célula T CD4⁺ Th17 possa ser a chave para a proteção induzida durante a vacinação contra tuberculose (da Costa et al., 2014; Monin et al., 2015; Wareham et al., 2014).

As células T CD8⁺ podem ser ativadas através de um processo denominado apresentação cruzada. Neste processo, vesículas contendo antígenos micobacterianos, muitas vezes oriundas de células apoptóticas, são fagocitadas pelos macrófagos e/ou DCs, processadas e os peptídeos antigênicos são apresentados na superfície celular via molécula de classe I do MHC (Behar, 2013; Schaible et al., 2003). As células T CD8⁺ contribuem na defesa contra o Mtb, principalmente, através da produção de IFN γ e da lise das células infectadas mediada por Fas (do inglês, *TNF superfamily member 6*) e FasL (do inglês, *TNF superfamily member 6 ligand*) ou perforina e granzima (Behar, 2013; Canaday et al., 2001; Ferraz et al., 2006). Bonato et al. (2004) mostraram ainda que a vacina terapêutica pHSP-65 (do inglês, *heat-shock protein 65 Mycobacterium leprae Gene*) induz a ativação das células T CD8⁺ nos pulmões de camundongos infectados com Mtb, contribuindo para o aumento da produção de IFN γ e, conseqüentemente, a diminuição da proliferação bacilífera (Bonato et al., 2004).

De fato, a ativação da resposta imune adquirida é fundamental para a formação e manutenção dos granulomas. A formação de granulomas na fase

crônica da infecção pulmonar contribui para o crescimento “latente” do bacilo. Sua estruturação se dá, principalmente, por meio do recrutamento de células T, macrófagos e DCs, dentre outras populações celulares, para o local da inflamação. Neste local, estas células formam um arcabouço circunscrito, composto por macrófagos e células gigantes multinucleadas infectados na região central e, principalmente, por linfócitos na periferia (Feldmann, Maini, 2001; Saunders et al., 1999). O papel do TNF- α na resposta granulomatosa à infecção por Mtb foi evidenciado com o aumento da reativação da tuberculose em pacientes com artrite reumatóide submetidos à terapia com anticorpos anti-TNF- α (Feldmann, Maini, 2001). O aparecimento de muitos granulomas circunscritos ou até mesmo difusos nos pulmões pode ocasionar o comprometimento deste órgão, devido à ampla área com necrose formada, levando o indivíduo à morte por disfunção pulmonar.

1.4 Mecanismos de progressão da doença

Muitos estudos vêm sendo realizados a fim de avaliar a relação entre virulência micobacteriana e aspectos relativos à ativação da resposta imune (Aguilar Leon et al., 2009; Dormans et al., 2004; Hernandez Pando et al., 2010; Martins de Sousa et al., 2010). No estudo acerca da patogenia gerada durante infecção pelo *M. avium* em modelo murino de infecção, nosso grupo mostrou que isolados com perfis indistinguíveis de DNA *fingerprint* por RFLP (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*) e epidemiologicamente não relacionados, foram distintos em sua capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro, disseminar e crescer no meio intracelular (Amaral et al., 2011). Porém, muito pouco é conhecido à respeito da relação entre a virulência/patogenicidade e capacidade imunomoduladora de isolados clínicos virulentos, pertencentes ao complexo Mtb, e como isto pode afetar a proteção do hospedeiro.

Outro fator do patógeno associado com a severidade da doença é sua capacidade em modular o tipo de morte celular. Tem sido descrito que macrófagos infectados com cepas micobacterianas avirulentas sofrem morte celular por apoptose, enquanto cepas virulentas são capazes de induzir morte celular do tipo necrótica (Amaral et al., 2015b; Behar et al., 2010; Dorhoi et al., 2011). A morte celular por apoptose seria importante para a eliminação do patógeno (Behar et al., 2010). Por outro lado, a necrose causada por cepas virulentas permite com que o

patógeno consiga evadir à imunidade inata e promove sua disseminação (Amaral et al., 2015b; Amaral et al., 2014; Behar et al., 2010; Mayer-Barber et al., 2014). Como consequência, é observado aumento da inflamação, refletindo em maior recrutamento celular para os pulmões. Foi descrito que cepas virulentas modulam a morte dos macrófagos infectados por induzirem aumento em expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 (do inglês, *Myeloid cell leukemia 1*), membro da família Bcl-2, levando à necrose celular (Sly et al., 2003). Além disso, a modulação do tipo de morte celular também está associada ao desbalanço na geração dos eicosanóides. Recentemente, foi mostrado que a dinâmica entre a IL-1 β , PGE2 (prostaglandina E 2) e IFNs do tipo 1 é crucial para o controle micobacteriano, bem como para a progressão da doença (Mayer-Barber et al., 2014). Cepas micobacterianas de perfil hipervirulento estimulam a produção de altos níveis de IFNs do tipo 1 e lipoxinas, levando os macrófagos infectados à morte por necrose (Mayer-Barber et al., 2014; O'Garra et al., 2013). Embora o IFN γ seja crítico para a resistência ao Mtb, os IFNs do tipo 1 regulam negativamente a defesa do hospedeiro (Manca et al., 2001). Uma evidência experimental desta regulação negativa é que camundongos deficientes no receptor de IFN α/β são resistentes à infecção micobacteriana (Mayer-Barber et al., 2014; O'Garra et al., 2013). IFNs do tipo 1 podem subverter a resposta do hospedeiro anti-tuberculose por inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-12, IL-1 β e iNOS, bem como por induzir mediadores anti-inflamatórios, tais como IL-10 e antagonista do receptor de IL-1 (IL1Ra) (Mayer-Barber et al., 2011; O'Garra et al., 2013). Além disso, a ausência da sinalização de IFNs do tipo 1 leva à indução de altos níveis de PGE2 e IL-1 β durante infecção de camundongos com a cepa H37Rv Mtb (Mayer-Barber et al., 2014).

Eicosanóides são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico que incluem a prostaglandina, resolvinas, lipoxinas e leucotrienos. As enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LO) ou 12/15-lipoxigenase (12/15-LO) competem entre si pelo ácido araquidônico para gerar prostaglandina ou lipoxinas e leucotrienos, respectivamente. Camundongos deficientes em 5-LO são resistentes à infecção por Mtb, enquanto camundongos Ptgs2^{-/-} (deficientes em COX-2) são suscetíveis à infecção, sugerindo que o balanço entre os mediadores lipídicos pode afetar a progressão da doença (Bafica et al., 2005b; Chen et al., 2006; Mayer-Barber et al., 2014). Diversos trabalhos mostraram que cepas avirulentas induzem maior produção de PGE2, enquanto cepas virulentas induzem produção de

lipoxina A4 (LXA4) e leucotrieno B4 (LTB4) (Chen et al., 2008; Chen et al., 2006; Divangahi et al., 2010; Mayer-Barber et al., 2014; Tobin, Ramakrishnan, 2013). Além disso, estes estudos mostraram um balanço positivo para indução de apoptose quando a geração de PGE2 é maior que LXA4, enquanto massiva destruição dos macrófagos infectados por necrose ocorre quando a produção de LXA4 é predominante. Ainda, a adição de PGE2 na cultura de macrófagos infectados com Mtb mostrou diminuir a carga bacteriana intracelular, bem como inibir a citólise, por proteger a desestabilização mitocondrial e facilitar o reparo da membrana plasmática (Divangahi et al., 2009; Mayer-Barber et al., 2014). Mayer-Barber e colaboradores (2014) mostraram que a sinalização via receptor de IL-1 é crucial para a indução de COX-2 e, conseqüentemente, para a geração de PGE2 (Mayer-Barber et al., 2014). Na ausência de IL-1R ou IL-1 α/β , altos níveis de IFN- β são observados nos pulmões dos camundongos infectados com Mtb. A administração adjunta de PGE2 e Zileuton, um inibidor de 5-LO, aos camundongos deficientes em IL-1 α/β , bem como aos camundongos C57BL/6 pré-tratados com Poly(I:C) (do inglês, *polyinosinic-polycytidylic acid*; um forte indutor de IFNs do tipo 1), induziu a proteção dos camundongos infectados, sendo observado diminuição na carga bacilar, lesão pulmonar e, conseqüentemente, aumento da sobrevivência dos animais. Baseados nestes achados, uma nova estratégia terapêutica é proposta para pacientes com tuberculose que apresentam altos níveis de IFNs do tipo 1.

1.4.1 Impacto da indução da necrose pulmonar

A modulação da morte celular pode impactar a ativação do sistema imune, bem como determinar a progressão da doença. A necrose de macrófagos infectados pode desencadear a liberação de moléculas chamadas de DAMPs (do inglês, *damage-associated molecular pattern molecules*), além de promover a disseminação do patógeno. DAMPs são moléculas, sejam de origem nuclear ou citosólica (Rubartelli, Lotze, 2007), que podem iniciar e propagar a resposta inflamatória em um contexto não infeccioso, bem como amplificar a ativação da resposta imune durante uma infecção (Di Virgilio, 2015; McDonald et al., 2010; Medzhitov, 2008). As proteínas que são consideradas DAMPs incluem as HSPs (Panayi et al., 2004), HMGB1 (do inglês, *high-mobility group box 1*) (Scaffidi et al., 2002) e proteínas derivadas da matriz extracelular, que são geradas com a injúria tecidual, tais como

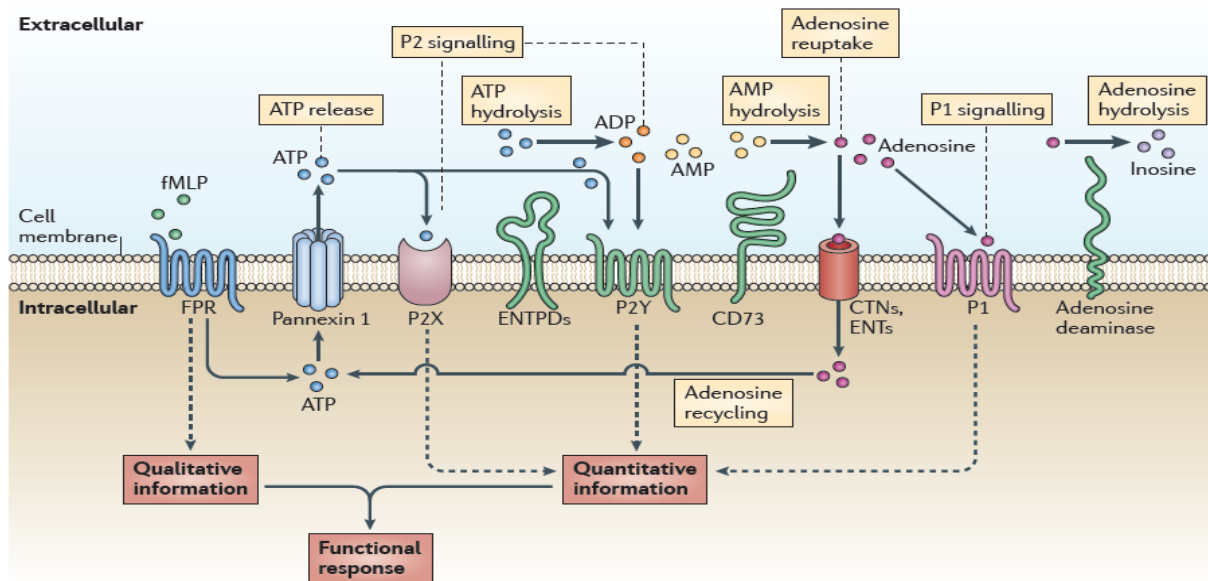
fragmentos hialurano (Scheibner et al., 2006). Além disso, temos DAMPs de origem não protéica que incluem o ATP, ácido úrico, heparina sulfato e o DNA (Boeynaems, Communi, 2006; Idzko et al., 2014; Junger, 2011; Shi et al., 2003). Enzimas endolisossomais, como as catepsinas, não são diretamente classificadas como DAMPs, mas uma vez liberadas no espaço extracelular, estas enzimas podem contribuir para a indução e amplificação do dano tecidual. Tem sido descrito que inibidores de enzimas lisossomais como, por exemplo, o inibidor da catepsina B, reduzem a inflamação e o dano tecidual (Canbay et al., 2003; Feng et al., 2013; Hoegen et al., 2011; Koslowski et al., 2003; Layton et al., 2001).

1.4.1.1 Sinalização Purinérgica, resposta inflamatória e morte celular

Nos últimos anos, os nucleotídeos (por exemplo, o ATP (adenosina trifosfato)) e os nucleosídeos (como as adenosinas) vêm ganhando grande importância tanto como DAMPs quanto como potentes moduladores da resposta imunológica (Amaral et al., 2015b; Di Virgilio, 2015; Idzko et al., 2014). O ATP é liberado em altas concentrações após ruptura da membrana plasmática durante o processo de necrose (Zeh, Lotze, 2005). Entretanto, baixa concentração de ATP pode ser liberada sem envolvimento de morte celular, via canais de panexinas e conexinas (Bodin, Burnstock, 2001; Jacob et al., 2013). O ATP pode agir como ativador celular, induzindo a liberação de citocinas por células inflamatórias, como um fator quimioatratador ou como fonte para geração de agentes bioativos (Hasko et al., 2008). O ATP extracelular (eATP) é rapidamente hidrolisado por ectonucleotidases, gerando ADP, AMP e adenosina, que por sua vez podem intervir na ativação celular (Yegutkin, 2008) (**Figura 3**).

Uma vez no espaço extracelular, estas moléculas são reconhecidas por receptores purinérgicos. Os receptores do tipo P1 são ativados por adenosinas e os receptores do tipo P2 são ativados por ATP e/ou outros nucleotídeos, por exemplo, UTP (uridina-5'-trifosfato) (**Figura 3**).

Figura 3: Metabolismo do ATP e sinalização purinérgica.



Fonte: Junger (2011)

Os receptores P2 são divididos em P2Y e P2X. Os receptores P2Y (metabotrópicos) são proteínas G-acopladas, e os receptores P2X (ionotrópicos) são canais iônicos (Junger, 2011). 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) (Abbracchio et al., 2009; Burnstock, 2007; Miller et al., 2011). Os receptores purinérgicos têm papel ambíguo, podendo funcionar como “amigos” ou “inimigos”. Por exemplo, Deterding e colaboradores (2007) mostraram que durante a fibrose cística, o tratamento de pacientes num curto espaço de tempo com um agonista do receptor P2Y2 induziu melhora no quadro inflamatório (Deterding et al., 2007). Porém, durante o tratamento prolongado foi observada a progressão da doença (Ratjen et al., 2012). Outros receptores purinérgicos estão associados com a indução de morte celular, por exemplo, o P2X7, que dependendo do nível de ativação, pode induzir morte celular apoptótica ou necrótica.

Os receptores de grupo P2X compartilham uma topologia comum com dois domínios transmembranas (TM1 e TM2), um domínio extracelular responsável pela ligação com o ATP e uma porção n-terminal intracelular. Alguns trabalhos sugerem que a forma funcional dos P2Xs é composta em trímeros, onde o ATP se liga e induz um rearranjo das subunidades, promovendo a abertura do canal iônico (Barrera et

al., 2005; Boumechache et al., 2009; Di Virgilio, 2015; Nicke et al., 1998; Wickert et al., 2013). O canal, uma vez aberto, promove o fluxo de iônico, por exemplo, o influxo de Na^+ e Ca^{2+} e o efluxo de K^+ , entre o compartimento intracelular e extracelular, culminando na despolarização da membrana plasmática. Elevados níveis de cálcio intracelular podem induzir forte ativação de quinases e fosfatases, ocasionando um desbalanço da sinalização celular. Por este fato, os receptores P2Xs possuem um papel importante na sinapse imunológica e, conseqüentemente, na indução da resposta imune (Di Virgilio, 2015; Khakh, North, 2006; Miller et al., 2011; Skaper et al., 2010).

Dentre os receptores P2X, o mais estudado é o P2X7. Este receptor é expresso em diversas células do sistema imune, tais como macrófagos, mastócitos, eosinófilos, DCs e linfócitos, porém podem ser encontrados também em células não hematopoiéticas (Burnstock, Ralevic, 2014; Di Virgilio et al., 2001; Idzko et al., 2014). Como mencionado anteriormente, este receptor está envolvido em diferentes processos celulares que vão desde ativação e proliferação celular até indução de morte celular (Adinolfi et al., 2005). O P2X7R é conhecido por ser um receptor purinérgico capaz de responder à alta concentração de eATP, principalmente observada em contexto de intenso dano celular e tecidual (Di Virgilio, 2015). Quando estimulado com eATP, o P2X7R induz a ativação do inflamassoma NLRP3, que pode culminar na geração de IL-1 β madura (Baron et al., 2015; Mariathasan et al., 2006; Piccini et al., 2008; Qu et al., 2007). Acredita-se que o efluxo de K^+ através do poro formado pelo P2X7R após o reconhecimento de eATP seja um fator importante para a ativação do inflamassoma NLRP3 (Katsnelson et al., 2015; Munoz-Planillo et al., 2013). Este desequilíbrio iônico celular pode contribuir para o estresse do retículo endoplasmático, que por sua vez regulará a desestabilização mitocondrial e geração de ROS via um sensor de estresse reticular denominado IRE1 α (do inglês, *inositol-requiring kinase 1*) (Bronner et al., 2015). Aparentemente, o P2X7R interage diretamente com o NLRP3 e, esta ligação, seria requerida para a ativação do inflamassoma NLRP3 (Franceschini et al., 2015). Ainda, o P2X7R poderia também interferir na geração de mediadores lipídicos, sendo importante para a geração de PGE2 (Barbera-Cremades et al., 2012). A função do P2X7R é determinada, principalmente, pela concentração de ATP presente no ambiente extracelular. Por exemplo, em baixas concentrações de eATP o P2X7R induz ativação celular, bem como a proliferação de linfócitos (Rissiek et al., 2015); por outro lado, em altas

concentrações de eATP o P2X7R induz morte celular, que pode ser necrótica ou apoptótica, dependendo do tempo de exposição ao ATP e do tipo celular (Adinolfi et al., 2005; Amaral et al., 2014; Di Virgilio, 1998; Di Virgilio et al., 1998).

A dependência do P2X7R na indução de morte necrótica de macrófagos alveolares foi recentemente reportada com uso do modelo de injúria pulmonar aguda induzida por LPS (Dagvadorj et al., 2015). Neste estudo foi mostrado que a administração de LPS via intratraqueal induziu elevados níveis de pro-IL1 α liberados por macrófagos alveolares em processo de necrose celular, culminando na ativação das células endoteliais. Após o estímulo com LPS, os macrófagos alveolares apresentaram intenso influxo de Ca²⁺ e depleção de ATP, ambos processos dependente da sinalização via P2X7R. Aparentemente, este fenômeno induzido pelo LPS depende da molécula CD14 que, por sua vez, se liga ao P2X7R, desencadeando, assim, o processo de necrose e liberação de IL-1 α (Dagvadorj et al., 2015). Xu e colaboradores (2015) mostraram que pacientes com injúria cerebral induzida por radiação apresentavam elevados níveis de eATP no fluido cefalorraquidiano. O aumento de eATP foi associado com elevados níveis de mediadores inflamatórios produzidos por neurônios e células da glia, bem como indução de morte celular, sendo este fenômeno totalmente dependente da sinalização via P2X7R (Xu et al., 2015).

Durante infecção de macrófagos por *M. bovis* BCG, foi observado que a ativação do P2X7R por eATP culmina na redução da carga bacteriana intracelular (Fairbairn et al., 2001; Lammas et al., 1997). Isto se deve ao fato do ATP induzir apoptose nos macrófagos infectados que, por sua vez, promoveria na morte do patógeno (Smith et al., 2001). Entretanto, dependendo da virulência do bacilo, a morte celular apoptótica pode ser inibida, podendo, assim, mudar o cenário da infecção (Behar et al., 2010).

Recentes estudos epidemiológicos têm mostrado que cepas de *Mtb* pertencentes ao genótipo *Beijing*, os quais estão associados com alta virulência, transmissibilidade e resistência a drogas (Hanekom et al., 2011), são capazes de causar progressão rápida da tuberculose primária do que cepas oriundas de outros genótipos (Amaral et al., 2014; Ribeiro et al., 2014; Thwaites et al., 2008). Além disso, cepas hipervirulentas do genótipo *Beijing*, são capazes de induzir tuberculose grave caracterizada por alta carga bacteriana, extensa consolidação pulmonar e áreas de necrose focal, sendo um importante modelo para avaliar formas graves da

doença (Aguilar et al., 2010; Amaral et al., 2014; Manca et al., 2001; Ordway et al., 2007; Ribeiro et al., 2014). Desta forma, poderíamos identificar se o reconhecimento de sinais de dano produzidos durante as formas graves da tuberculose poderia contribuir para o desenvolvimento da tuberculose progressiva.

1.5 Justificativa

Estudos experimentais, utilizando infecção com cepas hipervirulentas, permitiriam investigar aspectos da imunopatogênese por trás das formas agressiva da tuberculose. Desta forma, nosso grupo vem buscando entender os mecanismos de indução da tuberculose ativa, bem como a modulação do sistema imune durante o desenvolvimento da patologia grave, utilizando modelos de infecção experimental com isolados clínicos hipervirulentos. Nós hipotetizamos que a amplificação da necrose pulmonar, via reconhecimento de sinais de dano tecidual, poderia favorecer a progressão da doença, bem como a potencialização da resposta inflamatória.

Este estudo tem sua importância na elaboração de estratégias terapêuticas, que possibilitem retardar a progressão da doença, reduzindo, portanto, o tempo de tratamento com drogas anti-micobacterianas, além da minimização do surgimento de cepas resistentes às drogas anti-tuberculose.

Utilizando modelos murinos de indução de formas graves de tuberculose foi possível identificar o papel crucial do P2X7R na amplificação da necrose celular induzida pela micobactéria na infecção de macrófagos *in vitro*, bem como na progressão da doença *in vivo*. Os dados contidos nesta tese demonstram ainda o envolvimento de catepsinas lisossomais na formação do complexo inflamassoma NLRP3 induzida pelo antígeno micobacteriano ESAT-6, potencializando a produção de IL-1 β após a infecção micobactéria ou em resposta ao ATP via P2X7R. Além disso, a sinalização via receptores de adenosina, elicitados por adenosinas possivelmente geradas da degradação do ATP liberado durante a necrose celular, contribui para a desativação das células T CD4⁺ presentes no parênquima pulmonar no modelo de tuberculose grave. Este fenótipo de desativação ou estado de baixa ativação das células T CD4⁺ parenquimais foi revertido após o tratamento com cafeína, um inibidor dos receptores de adenosina. Em suma, estes achados abrem uma nova perspectiva de intervenção terapêutica em vias de sinalização associadas ao reconhecimento de dano celular, o que contribuiria para redução da imunopatologia gerada nas formas graves de tuberculose.

REFERÊNCIAS*

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhatsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neuroscience*. 2009;32(1):19-29.

Abdalla H, Srinivasan L, Shah S, Mayer-Barber KD, Sher A, Sutterwala FS, Briken V. *Mycobacterium tuberculosis* infection of dendritic cells leads to partially caspase-1/11-independent IL-1 β and IL-18 secretion but not to pyroptosis. *PLoS One*. 2012;7(7):e40722.

Adinolfi E, Pizzirani C, Idzko M, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F, Ferrari D. P2X(7) receptor: Death or life? *Purinergic Signaling*. 2005;1(3):219-27.

Aguilar D, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Hernandez-Pando R. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010;90(5):319-25.

Aguilar Leon D, Zumarraga MJ, Jimenez Oropeza R, Gioffre AK, Bernardelli A, Orozco Estevez H, Cataldi AA, Hernandez Pando R. *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2009;157(1):139-47.

Alcáis A, Quintana-Murci L, Thaler DS, Schurr E, Abel L, Casanova JL. Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1214:18-33.

Amaral EP. 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; 2011.

Amaral EP, Kipnis TL, de Carvalho EC, da Silva WD, Leao SC, Lasunskaja EB. Difference in virulence of *Mycobacterium avium* isolates sharing indistinguishable DNA fingerprint determined in murine model of lung infection. *PLoS One*. 2011;6(6):e21673.

Amaral EP, Lasunskaja E, D'Império-Lima MR. Isolation of lung infiltrating cell in mice. 2015a Available from: <http://www.bio-protocol.org/e1403>.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Amaral EP, Lasunskaja EB, D'Imperio-Lima MR. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2015b; pii: S1286-4579(15)00187-2 (*In press*)

Amaral EP, Ribeiro SC, Lanes VR, Almeida FM, de Andrade MR, Bomfim CC, Salles EM, Bortoluci KR, Coutinho-Silva R, Hirata MH, Alvarez JM, Lasunskaja EB, D'Imperio-Lima MR. Pulmonary infection with hypervirulent mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathogens*. 2014;10(7):e1004188.

Andrade BB, Pavan Kumar N, Amaral EP, Riteau N, Mayer-Barber KD, Tosh KW, Maier N, Conceicao EL, Kubler A, Sridhar R, Banurekha VV, Jawahar MS, Barbosa T, Manganiello VC, Moss J, Fontana JR, Marciano BE, Sampaio EP, Olivier KN, Holland SM, Jackson SH, Moayeri M, Leppla S, Sereti I, Barber DL, Nutman TB, Babu S, Sher A. Heme Oxygenase-1 Regulation of Matrix Metalloproteinase-1 Expression Underlies Distinct Disease Profiles in Tuberculosis. *Journal of Immunology*. 2015;195(6):2763-73.

Andrade BB, Pavan Kumar N, Sridhar R, Banurekha VV, Jawahar MS, Nutman TB, Sher A, Babu S. Heightened plasma levels of heme oxygenase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 as well as elevated peripheral neutrophil counts are associated with TB-diabetes comorbidity. *Chest*. 2014a;145(6):1244-54.

Andrade BB, Singh A, Narendran G, Schechter ME, Nayak K, Subramanian S, Anbalagan S, Jensen SM, Porter BO, Antonelli LR, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Meintjes G, van der Plas H, Follmann D, Barber DL, Swaminathan S, Sher A, Sereti I. Mycobacterial antigen driven activation of CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes is a predictor of tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *PLoS Pathogens*. 2014b;10(10):e1004433.

Andrade MR, Amaral EP, Ribeiro SC, Almeida FM, Peres TV, Lanes V, D'Imperio-Lima MR, Lasunskaja EB. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. *BMC Microbiology*. 2012;12:166.

Antonelli LR, Gigliotti Rothfuchs A, Goncalves R, Roffe E, Cheever AW, Bafica A, Salazar AM, Feng CG, Sher A. Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *Journal Clinical Investigation*. 2010;120(5):1674-82.

Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2004;8(8):924-37.

Bachran C, Gupta PK, Bachran S, Leysath CE, Hoover B, Fattah RJ, Leppla SH. Reductive methylation and mutation of an anthrax toxin fusion protein modulates its stability and cytotoxicity. *Scientific Reports*. 2014;4:4754.

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005a;202(12):1715-24.

Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, Aliberti J. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest*. 2005b;115(6):1601-6.

Barber GN. STING-dependent signaling. *Nature Immunology*. 2011;12(10):929-30.

Barbera-Cremades M, Baroja-Mazo A, Gomez AI, Machado F, Di Virgilio F, Pelegrin P. P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1beta release. *FASEB Journal*. 2012;26(7):2951-62.

Baron L, Gombault A, Fanny M, Villeret B, Savigny F, Guillou N, Panek C, Le Bert M, Lagente V, Rassendren F, Riteau N, Couillin I. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death and Diseases*. 2015;6:e1629.

Barrera L. The basic of clinical bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, editors. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care*. 2007 p. 93-112. . 2007 Available from: <http://www.tuberculosistextbook.com>. [2010 Oct 15].

Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(11):10759-65.

Behar SM. Antigen-specific CD8(+) T cells and protective immunity to tuberculosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;783:141-63.

Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nature Review Microbiology*. 2010;8(9):668-74.

Blair HC, Teitelbaum SL, Grosso LE, Lacey DL, Tan HL, McCourt DW, Jeffrey JJ. Extracellular-matrix degradation at acid pH. Avian osteoclast acid collagenase isolation and characterization. *The Biochemical Journal*. 1993;290 (Pt 3):873-84.

Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical Research*. 2001;26(8-9):959-69.

Boeynaems JM, Communi D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(5):943-4.

Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A, Coelho-Castelo AA, Silva CL. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology*. 2004;113(1):130-8.

Bonaventura J, Navarro G, Casado-Anguera V, Azdad K, Rea W, Moreno E, Brugarolas M, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Cortes A, Volkow ND, Schiffmann SN, Ferre S, Casado V. Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(27):E3609-18.

Boumechache M, Masin M, Edwardson JM, Gorecki DC, Murrell-Lagnado R. Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(20):13446-54.

Bronner DN, Abuaita BH, Chen X, Fitzgerald KA, Nunez G, He Y, Yin XM, O'Riordan MX. Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. *Immunity*. 2015;43(3):451-62.

Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, Vegran F, Boireau W, Simon B, Ryffel B, Connat JL, Kanellopoulos J, Martin F, Rebe C, Apetoh L, Ghiringhelli F. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nature Medicine*. 2013;19(1):57-64.

Brumatti G, Weinlich R, Chehab CF, Yon M, Amarante-Mendes GP. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS letters*. 2003;541(1-3):57-63.

Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *The Biochemical Journal*. 1992;282 (Pt 1):273-8.

Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, Arditi M. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(22):20961-7.

Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Science*. 2007;64(12):1471-83.

Burnstock G, Kennedy C. P2X receptors in health and disease. *Advances in Pharmacology*. 2011;61:333-72.

Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacology Review*. 2014;66(1):102-92.

Buttle DJ, Murata M, Knight CG, Barrett AJ. CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992;299(2):377-80.

Buyukdeligoz M, Hocaoglu N, Oransay K, Tuncok Y, Kalkan S. The Effects of the Adenosine Receptor Antagonists on the Reverse of Cardiovascular Toxic Effects Induced by Citalopram In-Vivo Rat Model of Poisoning. *Balkan Medical Journal*. 2015;32(3):303-8.

Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF, Boom WH. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *Journal of Immunology*. 2001;167(5):2734-42.

Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Feldstein A, Bronk SF, Rydzewski R, Tanai M, Gores GJ. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *Journal Clinical Investigation*. 2003;112(2):152-9.

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. Trends in Tuberculosis. 2008 Available from: <http://www.cdc.gov>. [2009 Jan 21].

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. Trends in Tuberculosis. 2014 Available from: <http://www.cdc.gov>. [2015 Jun 19].

Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infection and Immunity*. 1991;59(5):1755-61.

Chen CC, Tsai SH, Lu CC, Hu ST, Wu TS, Huang TT, Said-Sadier N, Ojcius DM, Lai HC. Activation of an NLRP3 inflammasome restricts *Mycobacterium kansasii* infection. *PloS One*. 2012;7(4):e36292.

Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annual Review Pathology*. 2009;4:365-98.

Chen M, Divangahi M, Gan H, Shin DS, Hong S, Lee DM, Serhan CN, Behar SM, Remold HG. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(12):2791-801.

Chen M, Gan H, Remold HG. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *Journal of Immunology*. 2006;176(6):3707-16.

Clemens DL. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Trends in Microbiology*. 1996;4(3):113-8.

Cole ST, Barrell BG. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Foundation symposium*. 1998;217:160-72; 72-7.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.

Compan V, Baroja-Mazo A, Lopez-Castejon G, Gomez AI, Martinez CM, Angosto D, Montero MT, Herranz AS, Bazan E, Reimers D, Mulero V, Pelegrin P. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity*. 2012;37(3):487-500.

Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of Internal Medicine*. 2003;163(9):1009-21.

Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2003;57:641-76.

Csoka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, Deitch EA, Spolarics Z, Nemeth ZH, Hasko G. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J*. 2008;22(10):3491-9.

Csoka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Nemeth ZH, Pacher P, Murray PJ, Kepka-Lenhart D, Morris SM, Jr., Gause WC, Leibovich SJ, Hasko G. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB Journal*. 2012;26(1):376-86.

da Costa AC, Costa-Junior Ade O, de Oliveira FM, Nogueira SV, Rosa JD, Resende DP, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. A new recombinant BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis. *PloS One*. 2014;9(11):e112848.

Dagvadorj J, Shimada K, Chen S, Jones HD, Tumurkhuu G, Zhang W, Wawrowsky KA, Crother TR, Arditi M. Lipopolysaccharide Induces Alveolar Macrophage Necrosis via CD14 and the P2X7 Receptor Leading to Interleukin-1alpha Release. *Immunity*. 2015;42(4):640-53.

Dayanim S, Lopez B, Maisonet TM, Grewal S, Londhe VA. Caffeine induces alveolar

apoptosis in the hyperoxia-exposed developing mouse lung. *Pediatric Research*. 2014;75(3):395-402.

de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, Brodin P, Honore N, Marchal G, Jiskoot W, England P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(16):6028-34.

Delbridge LM, O'Riordan MX. Innate recognition of intracellular bacteria. *Current Opinion Immunology*. 2007;19(1):10-6.

Deterding RR, Lavange LM, Engels JM, Mathews DW, Coquillet SJ, Brody AS, Millard SP, Ramsey BW. Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosal tetrasodium in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;176(4):362-9.

Di Virgilio F. ATP as a death factor. *Biofactors*. 1998;8(3-4):301-3.

Di Virgilio F. P2X receptors and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*. 2015;22(7):866-77.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, Baricordi OR. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death and Differentiation*. 1998;5(3):191-9.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 2001;97(3):587-600.

Divangahi M, Chen M, Gan H, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM, Fortune S, Behar SM, Remold HG. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nature Immunology*. 2009;10(8):899-906.

Divangahi M, Desjardins D, Nunes-Alves C, Remold HG, Behar SM. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Immunology*. 2010;11(8):751-8.

Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, Kozak R, Guillot L, Veyrier F, Kobayashi KS, Flavell RA, Gros P, Behr MA. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. *Journal of Immunology*. 2008;181(10):7157-65.

Dorhoi A, Reece ST, Kaufmann SH. For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunological Reviews*. 2011;240(1):235-51.

Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend

SM, van Soolingen D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clinical and Experimental Immunology*. 2004;137(3):460-8.

Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, Suva ML, Stehle JC, Kopf M, Stamenkovic I, Corradin G, Tschopp J. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One*. 2009;4(8):e6510.

Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Fremont C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The American Journal of Pathology*. 2004;164(1):49-57.

Dubois-Colas N, Petit-Jentreau L, Barreiro LB, Durand S, Soubigou G, Lecointe C, Klibi J, Rezai K, Lokiec F, Coppee JY, Gicquel B, Tailleux L. Extracellular adenosine triphosphate affects the response of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;210(5):824-33.

Dubyak GR. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cellular Microbiology*. 2012;14(11):1697-706.

Dunn PL, North RJ. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infection and Immunity*. 1995;63(9):3428-37.

Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, Lammas DA. ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *Journal of Immunology*. 2001;167(6):3300-7.

Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annual Review of Immunology*. 2001;19:163-96.

Feng Y, Ni L, Wang Q. Administration of cathepsin B inhibitor CA-074Me reduces inflammation and apoptosis in polymyositis. *Journal of Dermatological Science*. 2013;72(2):158-67.

Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Goldberg H, Marks GB, Wiley JS, Britton WJ. A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(4):360-6.

Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Wiley JS, Britton WJ. Gene dosage determines the negative effects of polymorphic alleles of the P2X7 receptor

on adenosine triphosphate-mediated killing of mycobacteria by human macrophages. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(1):149-55.

Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*. 2006;39(11):1387-97.

Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, Langenberg DM, van Crevel R, Adema GJ, Ottenhoff TH, Van der Meer JW, Netea MG. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*. 2005;1(3):279-85.

Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, Jouanguy E, Boisson-Dupuis S, Fieschi C, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Seminars in Immunology*. 2006;18(6):347-61.

Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and Immunity*. 2001;69(7):4195-201.

Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are necessary for protection against *M. tuberculosis* in mice. *Infectious Agents and Disease*. 1993;2(4):259-62.

Franceschini A, Capece M, Chiozzi P, Falzoni S, Sanz JM, Sarti AC, Bonora M, Pinton P, Di Virgilio F. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB Journal*. 2015;29(6):2450-61.

Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, Mangan MS, Zimmer S, Monks BG, Fricke M, Schmidt RE, Espevik T, Jones B, Jarnicki AG, Hansbro PM, Busto P, Marshak-Rothstein A, Hornemann S, Aguzzi A, Kastenmuller W, Latz E. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nature Immunology*. 2014;15(8):727-37.

Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *The Journal of Cell Biology*. 2001;154(3):631-44.

Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(9):5437-42.

Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis (Edinb)*.

2008;88(6):510-7.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(13):7877-82.

Gil O, Guirado E, Gordillo S, Diaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ariza A, Ausina V, Cardona PJ. 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 and Infection / Institut Pasteur. 2006;8(3):628-36.

Giunta S, Andriolo V, Castorina A. Dual blockade of the A1 and A2A adenosine receptor prevents amyloid beta toxicity in neuroblastoma cells exposed to aluminum chloride. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2014;54:122-36.

Glickman MS, Jacobs WR, Jr. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell. 2001;104(4):477-85.

Goncalves N, Simoes AT, Cunha RA, de Almeida LP. Caffeine and adenosine A(2A) receptor inactivation decrease striatal neuropathology in a lentiviral-based model of Machado-Joseph disease. Annals of Neurology. 2013;73(5):655-66.

Gopal R, Monin L, Slight S, Uche U, Blanchard E, Fallert Junecko BA, Ramos-Payan R, Stallings CL, Reinhart TA, Kolls JK, Kaushal D, Nagarajan U, Rangel-Moreno J, Khader SA. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 infection. PLoS Pathogens. 2014;10(5):e1004099.

Gorska AM, Golembiowska K. The role of adenosine A1 and A2A receptors in the caffeine effect on MDMA-induced DA and 5-HT release in the mouse striatum. Neurotoxicity Research. 2015;27(3):229-45.

Guenin-Mace L, Simeone R, Demangel C. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. Transboundary and Emerging Diseases. 2009;56(6-7):255-68.

Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology. 2004;51(2):359-70.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathogens. 2005;1(1):e5.

Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91(6):510-23.

Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(9):759-70.

Hentze H, Lin XY, Choi MS, Porter AG. Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death and Differentiation*. 2003;10(9):956-68.

Hernandez Pando R, Aguilar D, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C. Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010;90(4):268-77.

Hoegen T, Tremel N, Klein M, Angele B, Wagner H, Kirschning C, Pfister HW, Fontana A, Hammerschmidt S, Koedel U. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *Journal of Immunology*. 2011;187(10):5440-51.

Holscher C, Reiling N, Schaible UE, Holscher A, Bathmann C, Korbel D, Lenz I, Sonntag T, Kroger S, Akira S, Mossmann H, Kirschning CJ, Wagner H, Freudenberg M, Ehlers S. Containment of aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice does not require MyD88 adaptor function for TLR2, -4 and -9. *European Journal of Immunology*. 2008;38(3):680-94.

Hook V, Funkelstein L, Wegrzyn J, Bark S, Kindy M, Hook G. Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1824(1):89-104.

Hornung V, Latz E. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *European Journal of Immunology*. 2010;40(3):620-3.

Hughes AL, Friedman R, Murray M. Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*. 2002;8(11):1342-6.

Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*. 2014;509(7500):310-7.

Jacob F, Perez Novo C, Bachert C, Van Crombruggen K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signaling*. 2013;9(3):285-306.

Jayachandran R, Gatfield J, Massner J, Albrecht I, Zanolari B, Pieters J. RNA interference in J774 macrophages reveals a role for coronin 1 in mycobacterial trafficking but not in actin-dependent processes. *Molecular Biology Cell*. 2008;19(3):1241-51.

Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, Miyazaki T, Albrecht I, Massner J, Pieters J. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*. 2007;130(1):37-50.

Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, Son JW, Harding CV, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Song CH, Jo EK. The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infection and Immunity*. 2006;74(5):2686-96.

Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(3):201-12.

Junqueira-Kipnis AP, Basaraba RJ, Gruppo V, Palanisamy G, Turner OC, Hsu T, Jacobs WR, Jr., Fulton SA, Reba SM, Boom WH, Orme IM. Mycobacteria lacking the RD1 region do not induce necrosis in the lungs of mice lacking interferon-gamma. *Immunology*. 2006;119(2):224-31.

Kang SJ, Wang S, Hara H, Peterson EP, Namura S, Amin-Hanjani S, Huang Z, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Thornberry NA, Moskowitz MA, Yuan J. Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *The Journal of Cell Biology*. 2000;149(3):613-22.

Katsnelson MA, Rucker LG, Russo HM, Dubyak GR. K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *Journal of Immunology*. 2015;194(8):3937-52.

Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*. 2001;1(1):20-30.

Kaufmann SH, Andersen P. Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chemical Immunology*. 1998;70:21-59.

Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011;479(7371):117-21.

Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England Journal of Medicine*.

2001;345(15):1098-104.

Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008;41(2):79-83.

Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. 2006;442(7102):527-32.

Khan TA, Cabral-Marques O, Schimke LF, de Oliveira EB Jr, Amaral EP, D'Império Lima MR, Scancetti Tavares F, Costa Carvalho BT, Condino-Neto A. Tuberculosis in an autosomal recessive case of chronic granulomatous disease due to mutation of the NCF1 gene. *Allergology and Immunopathology*. 2015; pii: S0301-0546(15)00089-0.

Kim K, Sohn H, Kim JS, Choi HG, Byun EH, Lee KI, Shin SJ, Song CH, Park JK, Kim HJ. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0652 stimulates production of tumour necrosis factor and monocytes chemoattractant protein-1 in macrophages through the Toll-like receptor 4 pathway. *Immunology*. 2012;136(2):231-40.

Koslowski R, Knoch K, Kuhlisch E, Seidel D, Kasper M. Cathepsins in bleomycin-induced lung injury in rat. *The European Respiratory Journal*. 2003;22(3):427-35.

Kronsteiner B, Bassaganya-Riera J, Philipson C, Viladomiu M, Carbo A, Pedragosa M, Vento S, Hontecillas R. *Helicobacter pylori* infection in a pig model is dominated by Th1 and cytotoxic CD8+ T cell responses. *Infection and Immunity*. 2013;81(10):3803-13.

Kubler A, Larsson C, Luna B, Andrade BB, Amaral EP, Urbanowski M, Orandle M, Bock K, Ammerman NC, Cheung LS, Winglee K, Halushka M, Park JK, Sher A, Friedland JS, Elkington PT, Bishai WR. Cathepsin K contributes to cavitation and collagen turnover in pulmonary tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2015. pii: jiv458 (*In press*)

Kugler DG, Mittelstadt PR, Ashwell JD, Sher A, Jankovic D. CD4+ T cells are trigger and target of the glucocorticoid response that prevents lethal immunopathology in toxoplasma infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(10):1919-27.

Lage SL, Buzzo CL, Amaral EP, Matteucci KC, Massis LM, Icimoto MY, Carmona AK, D'Imperio Lima MR, Rodrigues MM, Ferreira LC, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(35):E3321-30.

Lage SL, Longo C, Branco LM, da Costa TB, Buzzo Cde L, Bortoluci KR. Emerging Concepts about NAIP/NLRC4 Inflammasomes. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:309.

Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014;157(5):1013-22.

Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne DS. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity*. 1997;7(3):433-44.

Lasunskaja E, Ribeiro SC, Manicheva O, Gomes LL, Suffys PN, Mokrousov I, Ferrazoli L, Andrade MR, Kritski A, Otten T, Kipnis TL, da Silva WD, Vishnevsky B, Oliveira MM, Gomes HM, Baptista IF, Narvskaya O. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*. 2010;12(6):467-75.

Layton GT, Harris SJ, Bland FA, Lee SR, Fearn S, Kaleta J, Wood ML, Bond A, Ward G. Therapeutic effects of cysteine protease inhibition in allergic lung inflammation: inhibition of allergen-specific T lymphocyte migration. *Inflammation research : Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*. 2001;50(8):400-8.

Lee J, Repasy T, Papavinasasundaram K, Sasseti C, Kornfeld H. *Mycobacterium tuberculosis* induces an atypical cell death mode to escape from infected macrophages. *PloS One*. 2011;6(3):e18367.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003;187(1):117-23.

Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, Hill AV, Lammas DA. Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(10):1458-62.

Lin PL, Rutledge T, Green AM, Bigbee M, Fuhrman C, Klein E, Flynn JL. CD4 T cell depletion exacerbates acute *Mycobacterium tuberculosis* while reactivation of latent infection is dependent on severity of tissue depletion in cynomolgus macaques. *AIDS research and human retroviruses*. 2012;28(12):1693-702.

Liu G, Xu J, Wu H, Sun D, Zhang X, Zhu X, Magez S, Shi M. IL-27 Signaling Is Crucial for Survival of Mice Infected with African Trypanosomes via Preventing Lethal Effects of CD4+ T Cells and IFN-gamma. *PLoS pathogens*. 2015;11(7):e1005065.

Liu S, Leung HJ, Leppla SH. Characterization of the interaction between anthrax toxin and its cellular receptors. *Cellular Microbiology*. 2007;9(4):977-87.

Lopez M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *Journal of Immunology*. 2003;170(5):2409-16.

Maier NK, Crown D, Liu J, Leppla SH, Moayeri M. Arsenic trioxide and other arsenical compounds inhibit the NLRP1, NLRP3, and NAIP5/NLRC4 inflammasomes. *Journal of Immunology*. 2014;192(2):763-70.

Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, 3rd, Freedman VH, Kaplan G. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(10):5752-7.

Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2007;20(3):435-45.

Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. *Mycobacterium tuberculosis* activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host & Microbe*. 2012;11(5):469-80.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006;440(7081):228-32.

Martins de Sousa E, Bonfim de Bortoli F, Amaral EP, Batista AC, Liberman Kipnis T, Marques Cardoso A, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Acute immune response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infection and Immunity*. 2010;78(4):1571-81.

Matthias D. Infecções por Micobactérias. In: J B, editor. *Doenças infecciosas em animais domésticos*. ROCA ed. São Paulo 1998. p. 261.

Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, Caspar P, Oland S, Gordon S, Sher A. Innate and adaptive interferons suppress IL-1alpha and IL-1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity*. 2011;35(6):1023-34.

Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, Amaral EP, Barber DL, Gonzales J, Derrick SC, Shi R, Kumar NP, Wei W, Yuan X, Zhang G, Cai Y, Babu S, Catalfamo M, Salazar AM, Via LE, Barry CE, 3rd, Sher A. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*. 2014;511(7507):99-103.

McColl SR, St-Onge M, Dussault AA, Laflamme C, Bouchard L, Boulanger J, Pouliot M. Immunomodulatory impact of the A2A adenosine receptor on the profile of chemokines produced by neutrophils. *FASEB Journal*. 2006;20(1):187-9.

McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kuberski P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010;330(6002):362-6.

Medina E, Ryan L, LaCourse R, North RJ. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is

manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. *Tuberculosis* (Edinb). 2006;86(1):20-7.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.

Miller CM, Boulter NR, Fuller SJ, Zakrzewski AM, Lees MP, Saunders BM, Wiley JS, Smith NC. The role of the P2X(7) receptor in infectious diseases. *PLoS Pathogens*. 2011;7(11):e1002212.

Misasi J, Chandran K, Yang JY, Considine B, Filone CM, Cote M, Sullivan N, Fabozzi G, Hensley L, Cunningham J. Filoviruses require endosomal cysteine proteases for entry but exhibit distinct protease preferences. *Journal of Virology*. 2012;86(6):3284-92.

Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacoheh N, Griffiths G, Moita LF, Anes E. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cellular Microbiology*. 2010;12(8):1046-63.

Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2006;6(10):764-75.

Mokrousov I, Sapozhnikova N, Narvskaya O. *Mycobacterium tuberculosis* co-existence with humans: making an imprint on the macrophage P2X(7) receptor gene? *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57(Pt 5):581-4.

Monin L, Griffiths KL, Slight S, Lin Y, Rangel-Moreno J, Khader SA. Immune requirements for protective Th17 recall responses to *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Mucosal Immunology*. 2015;8(5):1099-109.

Montaser M, Lalmanach G, Mach L. CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biological Chemistry*. 2002;383(7-8):1305-8.

Mortaz E, Adcock IM, Tabarsi P, Masjedi MR, Mansouri D, Velayati AA, Casanova JL, Barnes PJ. Interaction of Pattern Recognition Receptors with *Mycobacterium Tuberculosis*. *Journal Clinical Immunology*. 2014.

MS. Ministério da Saúde do Brasil. 2015 Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/setembro/24/taxa-incid-ncia-tuberculose-1999-2014-base-JUN-2015.pdf>. [2015 Oct 15].

Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, Smith BL, Rajendiran TM, Nunez G. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142-53.

Myers AJ, Eilertson B, Fulton SA, Flynn JL, Canaday DH. The purinergic P2X7

receptor is not required for control of pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*. 2005;73(5):3192-5.

Neres R, Marinho CR, Goncalves LA, Catarino MB, Penha-Goncalves C. Pregnancy outcome and placenta pathology in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. *PLoS One*. 2008;3(2):e1608.

Newman ZL, Leppla SH, Moayeri M. CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. *Infection and Immunity*. 2009;77(10):4327-36.

Newton SM, Smith RJ, Wilkinson KA, Nicol MP, Garton NJ, Staples KJ, Stewart GR, Wain JR, Martineau AR, Fandrich S, Smallie T, Foxwell B, Al-Obaidi A, Shafi J, Rajakumar K, Kampmann B, Andrew PW, Ziegler-Heitbrock L, Barer MR, Wilkinson RJ. A deletion defining a common Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* associates with immune subversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(42):15594-8.

Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO Journal*. 1998;17(11):3016-28.

Nino-Moreno P, Portales-Perez D, Hernandez-Castro B, Portales-Cervantes L, Flores-Meraz V, Baranda L, Gomez-Gomez A, Acuna-Alonzo V, Granados J, Gonzalez-Amaro R. P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007;148(3):469-77.

North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annual Reviews of Immunology*. 2004;22:599-623.

O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annual Reviews of Immunology*. 2013;31:475-527.

Okafor CC, Grooms DL, Bruning-Fann CS, Averill JJ, Kaneene JB. Descriptive epidemiology of bovine tuberculosis in Michigan (1975-2010): lessons learned. *Veterinary Medicine International*. 2011;2011:874924.

Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *Journal of Immunology*. 2010;184(8):4414-22.

Ordway D, Henao-Tamayo M, Harton M, Palanisamy G, Trout J, Shanley C, Basaraba RJ, Orme IM. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *Journal of Immunology*. 2007;179(1):522-31.

Orlowski GM, Colbert JD, Sharma S, Bogyo M, Robertson SA, Rock KL. Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 β Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 β Activation. *Journal of Immunology*. 2015;195(4):1685-97.

Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology*. 1987;138(1):293-8.

Orme IM, Miller ES, Roberts AD, Furney SK, Griffin JP, Dobos KM, Chi D, Rivoire B, Brennan PJ. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *Journal of Immunology*. 1992;148(1):189-96.

Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathogens*. 2012;8(5):e1002607.

Panayi GS, Corrigan VM, Henderson B. Stress cytokines: pivotal proteins in immune regulatory networks; Opinion. *Current Opinion in Immunology*. 2004;16(4):531-4.

Park S, Leppla SH. Optimized production and purification of *Bacillus anthracis* lethal factor. *Protein Expression and Purification*. 2000;18(3):293-302.

Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(2):103-11.

Pawlowski A, Jansson M, Skold M, Rottenberg ME, Kallenius G. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathogens*. 2012;8(2):e1002464.

Petit-Jentreau L, Jouvion G, Charles P, Majlessi L, Gicquel B, Tailleux L. Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Deficiency in *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Mice Enhances Neutrophil Recruitment. *Infection and Immunity*. 2015;83(9):3666-74.

Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(23):8067-72.

Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*. 2001;3(3):249-55.

Placido R, Auricchio G, Falzoni S, Battistini L, Colizzi V, Brunetti E, Di Virgilio F, Mancino G. P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability. *Cellular Immunology*. 2006;244(1):10-8.

Pomerantsev AP, Pomerantseva OM, Moayeri M, Fattah R, Tallant C, Leppla SH. A *Bacillus anthracis* strain deleted for six proteases serves as an effective host for production of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. 2011;80(1):80-90.

Portevin D, Gagneux S, Comas I, Young D. Human macrophage responses to clinical isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* complex discriminate between ancient and modern lineages. *PLoS Pathogens*. 2011;7(3):e1001307.

Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology*. 2002;46(3):709-17.

Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of Immunology*. 2007;179(3):1913-25.

Ratjen F, Durham T, Navratil T, Schaberg A, Accurso FJ, Wainwright C, Barnes M, Moss RB. Long term effects of denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrose*. 2012;11(6):539-49.

Redford PS, Boonstra A, Read S, Pitt J, Graham C, Stavropoulos E, Bancroft GJ, O'Garra A. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *European Journal of Immunology*. 2010;40(8):2200-10.

Reece ST, Loddenkemper C, Askew DJ, Zedler U, Schommer-Leitner S, Stein M, Mir FA, Dorhoi A, Mollenkopf HJ, Silverman GA, Kaufmann SH. Serine protease activity contributes to control of *Mycobacterium tuberculosis* in hypoxic lung granulomas in mice. *Journal Clinical Investigation*. 2010;120(9):3365-76.

Repasy T, Lee J, Marino S, Martinez N, Kirschner DE, Hendricks G, Baker S, Wilson AA, Kotton DN, Kornfeld H. Intracellular bacillary burden reflects a burst size for *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *PLoS Pathogens*. 2013;9(2):e1003190.

Resende NM, Gazzinelli-Guimaraes PH, Barbosa FS, Oliveira LM, Nogueira DS, Gazzinelli-Guimaraes AC, Goncalves MT, Amorim CC, Oliveira FM, Caliani MV, Rachid MA, Volpato GT, Bueno LL, Geiger SM, Fujiwara RT. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasites & Vectors*. 2015;8:354.

Ribeiro JA, Sebastiao AM. Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;20 Suppl 1:S3-15.

Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MR, Almeida FM, Rezende AL, Lanes VR, Carvalho EC, Suffys PN, Mokrousov I, Lasunskaja EB. *Mycobacterium*

tuberculosis strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(7):2615-24.

Riley LW. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *Journal Clinical Investigation*. 2006;116(6):1475-8.

Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:204.

Robinson MW, O'Brien R, Mackintosh CG, Clark RG, Griffin JF. Immunoregulatory cytokines are associated with protection from immunopathology following *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* infection in red deer. *Infection and Immunity*. 2011;79(5):2089-97.

Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology*. 2007;28(10):429-36.

Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS Journal*. 2010;277(3):605-26.

Sakai S, Kauffman KD, Schenkel JM, McBerry CC, Mayer-Barber KD, Masopust D, Barber DL. Cutting edge: control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subset of lung parenchyma-homing CD4 T cells. *Journal of Immunology*. 2014a;192(7):2965-9.

Sakai S, Mayer-Barber KD, Barber DL. Defining features of protective CD4 T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Immunology*. 2014b;29:137-42.

Santos AA, Jr., Rodrigues-Junior V, Zanin RF, Borges TJ, Bonorino C, Coutinho-Silva R, Takyia CM, Santos DS, Campos MM, Morrone FB. Implication of purinergic P2X7 receptor in *M. tuberculosis* infection and host interaction mechanisms: a mouse model study. *Immunobiology*. 2013;218(8):1104-12.

Saunders BM, Fernando SL, Sluyter R, Britton WJ, Wiley JS. A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-mediated killing of mycobacteria. *Journal of Immunology*. 2003;171(10):5442-6.

Saunders BM, Frank AA, Orme IM. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*. 1999;98(3):324-8.

Sawynok J, Reid AR. Caffeine inhibits antinociception by acetaminophen in the formalin test by inhibiting spinal adenosine A(1) receptors. *European Journal of Pharmacology*. 2012;674(2-3):248-54.

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191-5.

Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med*. 2003;9(8):1039-46.

Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *Journal of Immunology*. 2006;177(2):1272-81.

Schotte P, Van Criekinge W, Van de Craen M, Van Loo G, Desmedt M, Grooten J, Cornelissen M, De Ridder L, Vandekerckhove J, Fiers W, Vandenabeele P, Beyaert R. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochemical and Biophysical Research and Communication*. 1998;251(1):379-87.

Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clinical microbiology reviews*. 1995;8(2):180-99.

Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, Singh M, O'Hagan DT, Petrilli V, Tschopp J, O'Neill LA, Lavelle EC. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(3):870-5.

Shenderov K, Riteau N, Yip R, Mayer-Barber KD, Oland S, Hieny S, Fitzgerald P, Oberst A, Dillon CP, Green DR, Cerundolo V, Sher A. Cutting edge: Endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1 β in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway. *Journal of Immunology*. 2014;192(5):2029-33.

Sherman DR, Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Smith S. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Delta RD1 is more virulent than *M. bovis* bacille Calmette-Guerin in long-term murine infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004;190(1):123-6.

Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003;425(6957):516-21.

Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R, Enninga J. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathogens*. 2012;8(2):e1002507.

Skaper SD, Debetto P, Giusti P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB Journal*. 2010;24(2):337-45.

Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, McMaster WR. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon

induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *Journal of Immunology*. 2003;170(1):430-7.

Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology reviews*. 2003;16(3):463-96.

Smith RA, Alvarez AJ, Estes DM. The P2X7 purinergic receptor on bovine macrophages mediates mycobacterial death. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001;78(3-4):249-62.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(18):9869-74.

Steger R, Kamal A, Lutchman S, Intrabartolo L, Sohail R, Brumberg JC. Chronic caffeine ingestion causes microglia activation, but not proliferation in the healthy brain. *Brain Research Bulletin*. 2014;106:39-46.

Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual Reviews Immunology*. 2012;30:1-22.

Stober CB, Lammas DA, Li CM, Kumararatne DS, Lightman SL, McArdle CA. ATP-mediated killing of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin within human macrophages is calcium dependent and associated with the acidification of mycobacteria-containing phagosomes. *Journal of Immunology*. 2001;166(10):6276-86.

Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 1994;263(5147):678-81.

Sullivan BM, Jobe O, Lazarevic V, Vasquez K, Bronson R, Glimcher LH, Kramnik I. Increased susceptibility of mice lacking T-bet to infection with *Mycobacterium tuberculosis* correlates with increased IL-10 and decreased IFN-gamma production. *Journal of Immunology*. 2005;175(7):4593-602.

Sundaramurthy V, Pieters J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*. 2007;9(14-15):1671-9.

Tanne A, Neyrolles O. C-type lectins in immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*. 2011;3:1147-64.

Taype CA, Shamsuzzaman S, Accinelli RA, Espinoza JR, Shaw MA. Genetic susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population.

Infection Genetic Evolution. 2010;10(4):495-504.

Tekin D, Kayaalti Z, Dalgic N, Cakir E, Soylemezoglu T, Isin Kutlubay B, Aydin Kilic B. Polymorphism in the p2x7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis in Turkish children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2010;29(8):779-82.

Terada K, Yamada J, Hayashi Y, Wu Z, Uchiyama Y, Peters C, Nakanishi H. Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1beta in chromogranin A-stimulated microglia. *Glia*. 2010;58(1):114-24.

Thwaites G, Caws M, Chau TT, D'Sa A, Lan NT, Huyen MN, Gagneux S, Anh PT, Tho DQ, Torok E, Nhu NT, Duyen NT, Duy PM, Richenberg J, Simmons C, Hien TT, Farrar J. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(4):1363-8.

Tobin DM, Ramakrishnan L. TB: the Yin and Yang of lipid mediators. *Current Opinion in Pharmacology*. 2013;13(4):641-5.

Tong B, Yu J, Wang T, Dou Y, Wu X, Kong L, Dai Y, Xia Y. Sinomenine suppresses collagen-induced arthritis by reciprocal modulation of regulatory T cells and Th17 cells in gut-associated lymphoid tissues. *Molecular Immunology*. 2015;65(1):94-103.

Towatari T, Nikawa T, Murata M, Yokoo C, Tamai M, Hanada K, Katunuma N. Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. *FEBS Letters*. 1991;280(2):311-5.

Turk B, Dolenc I, Turk V, Bieth JG. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*. 1993;32(1):375-80.

Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochemical and Biophysical Acta*. 2012;1824(1):68-88.

Ullrich HJ, Beatty WL, Russell DG. Interaction of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes with the antigen presentation pathway. *Journal of Immunology*. 2000;165(11):6073-80.

Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *Journal of Immunology*. 2007;178(6):3786-96.

Valimaki E, Miettinen JJ, Lietzen N, Matikainen S, Nyman TA. Monosodium urate activates Src/Pyk2/PI3 kinase and cathepsin dependent unconventional protein secretion from human primary macrophages. *Molecular & Cellular Proteomics* : MCP.

2013;12(3):749-63.

van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(2):294-309.

van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, BelohradskyBH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granuloma-tous disease: the European experience. *PLoS ONE*. 2009;4:e5234.4

van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129(7):1287-98.

Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, Sterling A, Fiers W, Vandenabeele P, Grooten J. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Letters*. 1998;438(3):150-8.

Vega-Ramos J, Alari-Pahissa E, Valle JD, Carrasco-Marin E, Esplugues E, Borrás M, Martínez AC, Lauzurica P. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology and Cell Biology*. 2010;88(7):707-15.

Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(1):6-21.

Wang H, Han YF, Chan YS, He J. Stimulus-specific adaptation at the synapse level in vitro. *PloS One*. 2014a;9(12):e114537.

Wang T, Xi NN, Chen Y, Shang XF, Hu Q, Chen JF, Zheng RY. Chronic caffeine treatment protects against experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: therapeutic window and receptor subtype mechanism. *Neuropharmacology*. 2014b;86:203-11.

Wang X, Xiao H, Lan H, Mao C, Chen Q. Lack of association between the P2X7 receptor A1513C polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Respirology*. 2011;16(5):790-5.

Wareham AS, Tree JA, Marsh PD, Butcher PD, Dennis M, Sharpe SA. Evidence for a role for interleukin-17, Th17 cells and iron homeostasis in protective immunity against tuberculosis in cynomolgus macaques. *PloS One*. 2014;9(2):e88149.

Welin A, Eklund D, Stendahl O, Lerm M. Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing *M. tuberculosis* undergo caspase-1- and cathepsin B-independent necrosis. *PloS One*. 2011;6(5):e20302.

Welin A, Winberg ME, Abdalla H, Sarndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, Lerm M.

Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infection and Immunity*. 2008;76(7):2882-7.

World Health Organization(WHO). Global Tuberculosis Report, 2013. Geneva: World Health Organization. 2014.

Wickert LE, Blanchette JB, Waldschmidt NV, Bertics PJ, Denu JM, Denlinger LC, Lenertz LY. The C-terminus of human nucleotide receptor P2X7 is critical for receptor oligomerization and N-linked glycosylation. *PloS One*. 2013;8(5):e63789.

Wong KW, Jacobs WR, Jr. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology*. 2011;13(9):1371-84.

Xu P, Xu Y, Hu B, Wang J, Pan R, Murugan M, Wu LJ, Tang Y. Extracellular ATP enhances radiation-induced brain injury through microglial activation and paracrine signaling via P2X7 receptor. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015.

Yamamoto A, Kaji T, Tomoo K, Ishida T, Inoue M, Murata M, Kitamura K. Crystallization and preliminary X-ray study of the cathepsin B complexed with CA074, a selective inhibitor. *Journal of Molecular Biology*. 1992;227(3):942-4.

Yang W, Ding X, Deng J, Lu Y, Matsuda Z, Thiel A, Chen J, Deng H, Qin Z. Interferon-gamma negatively regulates Th17-mediated immunopathology during mouse hepatitis virus infection. *Journal of Molecular Medicine*. 2011;89(4):399-409.

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimical and Biophysical Acta*. 2008;1783(5):673-94.

Zeh HJ, 3rd, Lotze MT. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *Journal of Immunotherapy*. 2005;28(1):1-9.