GISLANE DE ALMEIDA SANTOS

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

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

São Paulo, 2022

GISLANE DE ALMEIDA SANTOS

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

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Maria Regina D'Império Lima

Coorientadora: Elena Lassounskaia

Versão original

São Paulo, 2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gislane de Almeida Santos

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

Orientador: Profª. Drª Maria Regina D'Império Lima

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

( ) Aprovado (a) **( ) Reprovado (a)**

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Instituto de Ciências Biomédicas
ICB USP
Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

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

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

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 48 meses Depto/Setor: Imunologia

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

São Paulo, 23 de maio de 2021

Instituto
de Ciências
Biomédicas
ICB USP
Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
Comissão de Ética no Uso de Animais

Luciane Valéria Sita

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

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

Instituto de Ciências Biomédicas
ICB USP
Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 07 de junho de 2021
CEUA N 3185080318

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

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

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

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

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

Comentário da CEUA: "A CEUA autoriza a inclusão de 125 camundongos machos C57Bl6, 130 camundongos machos CD57BL/6 CD39 KO, 5 camundongos fêmeas CD57BL/6 CD39 KO, 30 camundongos machos C57BL/6 FOXP3 GFP e 5 camundongos fêmeas C57BL/6 FOXP3 GFP provenientes do Biotério do Departamento de Imunologia no projeto CEUA Nº 3185080318.".

Luciane Valéria Sita

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

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

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

CEUA/FCF **072.2021 – CEUA 626**

C E R T I F I C A D O

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

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

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

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

São Paulo, 05 de novembro de 2021

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

GOVERNO DO ESTADO
RIO DE JANEIRO
Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

REITORIA
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

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

Campos dos Goytacazes, 25 de maio de 2025.

Clóvis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
Tel.: (22) 2739-4178 - (22) – 2739-7180 correio eletrônico: adrianafaria@uenf.br

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A todos vocês, meu muito obrigada!

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

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

Luis Pasteur

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

RESUMO

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

ABSTRACT

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência mundial da tuberculose em 2020, (Global Tuberculosis Report, WHO, 2021). 27
Figura 2. Resposta imune durante a infecção por Mtb (O'garra et al., 2013) 29
Figura 3. Principais características da tuberculose: da infecção à defesa do hospedeiro (Kaufmann et al., 2001). 30
Figura 4. Estrutura e constituintes celulares do granuloma tuberculoso (Ramakrishnan et al., 2012) 31
Figura 5. Localização celular e função dos isotipos da E-NTPDase. 34
Figura 6. Proteínas de membrana e metabólitos da sinalização purinérgica (Eberhardt et al., 2022) 35
Figura 7. Papel dual do receptor P2RX7 na infecção por Mtb. (Eberhardt et al., 2022) 38
Figura 8. Avaliação da expressão das moléculas purinérgicas CD39, CD73 e P2X7 no pulmão de camundongos infectados.Erro! Indicador não definido.
Figura 9. Análise da expressão de CD39 em células imunes do pulmão durante o curso de infecção por Mtb altamente virulenta.Erro! Indicador não definido.
Figura 10. Avaliação da viabilidade de MDMOs após infecção com Mtb altamente virulenta...... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 11. Avaliação dos efeitos da deficiência de CD39 no aumento da morbidade dos camundongos infectados. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 12. Avaliação dos efeitos da deficiência de CD39 em baixa dose de infecção por Mtb altamente virulenta. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 13. Avaliação do efeito da deficiência de CD39 na resposta de células mielóides e produção de citocinas no pulmão de camundongos infectados. ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 14. Avaliação do efeito da deficiência de CD39 na resposta de células T no pulmão de camundongos infectados.Erro! Indicador não definido.

Figura 15. Visão geral das diferenças na resposta imune observada entre camundongos C57BL/6 e Entpd1$^{-/-}$ (Feito com Biorender)Erro! Indicador não definido.

Figura 16. A inibição do receptor P2X7R previne a morte celular durante a digestão pulmonar e processamento para obtenção de suspensões celulares para Citometria de Fluxo...... **Erro! Indicador não definido.**

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACK - *Ammonium-Chloride-Potassium*

ADC - Albumina, Dextrose, Catalase

ADO - Adenosina

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BCG - bacilo de Calmette-Guérin

BMDM – *Bone marrow-derived macrophages*

Ca^{2+} - Cálcio

CCL - *C-C motif chemokine ligand*

CD – *Cluster differentiation*

CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais

CFSE - *Carboxifluoresceína succinimidil éster*

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

DAMPs - padrões moleculares associados à dano

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

eATP - ATP extracelular

E-NTPDases - nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases

GMFI - Média geométrica da intensidade de fluorescencia

HE - hematoxilina-eosina

HEPA - *High Eficiency Particulate Air*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

i.p. - Intraperitoneal

i.v. - Via intravenosa

IFN – *Interferon*

IGRAs - *Interferon-gamma release assays*

IL - Interleucina

Mbv - *Mycobacterium bovis*

MDMO – Macrófagos derivados de medula óssea

MHC - *Major histocompatibility complex*

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NLRP3 – *Nod like receptor 3*

p.i. – pós-infecção

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*

SFB - Soro fetal bovino

TB - Tuberculose

TB-MDR - Tuberculose resistente a múltiplas drogas

TCR - receptor de células T

TNF - *Tumor necrosis factor*

Tregs – células T regulatórias

tSNE - *t-distributed stochastic neighbor embedding*

UFC - Unidades formadoras de colônias (UFC).

ZN - Ziehl Neelsen

α - Alfa

β – Beta

γ – Gama

δ – Delta

SUMÁRIO

1. Introdução 25

1.1. A tuberculose 26

1.2. Epidemiologia da TB 27

1.3. Resposta imune ao Mtb 28

1.4. Sinalização purinérgica 32

1.5. Regulação da resposta imune mediada pela atividade de CD39 36

1.6. Sinalização purinérgica da resposta imune durante a TB 37

2. Objetivos 41

2.1. Objetivo geral 42

2.2. Objetivos específicos: 42

3. Material e métodos 43

4. Resultados ..... **Erro! Indicador não definido.**

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

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

4.3. Macrófagos derivados de medula são mais suscetíveis à morte celular e liberam mais Mtb na ausência de expressão de CD39**Erro! Indicador não definido.**

4.4. Deficiência de CD39 induz tuberculose letal em camundongos infectados ..... **Erro! Indicador não definido.**

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

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

4.7. Deficiência de CD39 resulta em menor número de células T $CD4^+$ naïves no pulmão e induz aumento da expressão de CD69 em células ativadas **Erro! Indicador não definido.**

5. Discussão ..... **Erro! Indicador não definido.**

6. Conclusão..... **Erro! Indicador não definido.**

7. Referências..... 49

8. Apêndices ..... **Erro! Indicador não definido.**

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

8.2. Apêndice B: Estratégia de análise da citometria de fluxo.....**Erro! Indicador não definido.**

8.3. Apêndice C: P2x7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis.....**Erro! Indicador não definido.**

8.4. Apêndice D: Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria **Erro! Indicador não definido.**

1.Introdução

1.1. A tuberculose

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

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

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

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

1.2. Epidemiologia da TB

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

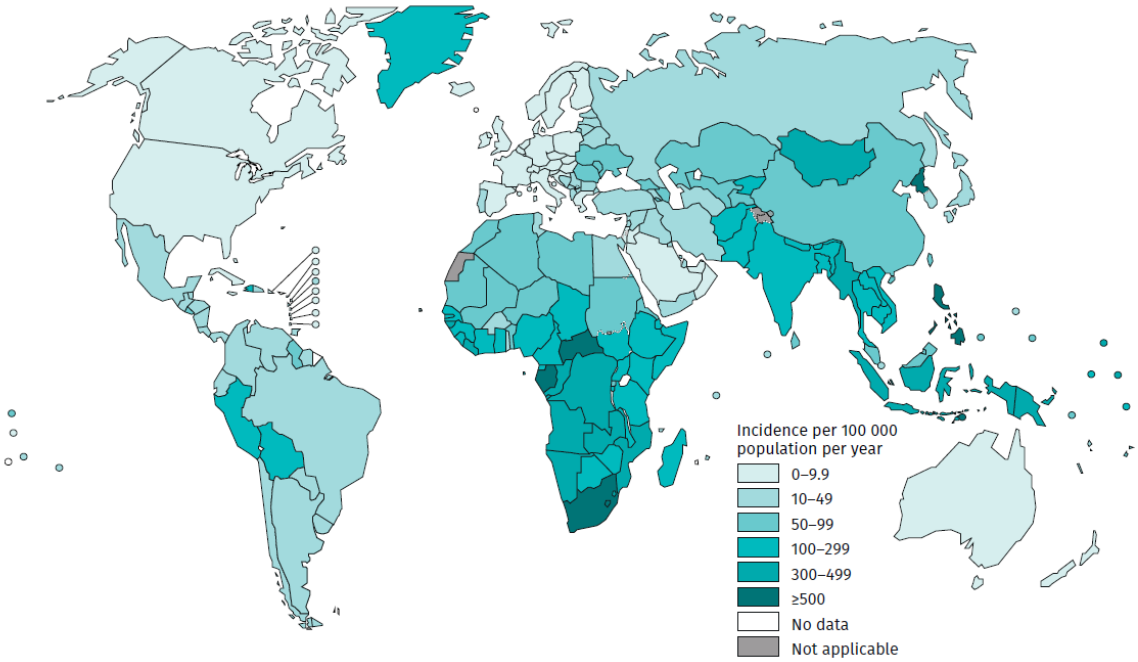

Figura 1. Incidência mundial da tuberculose em 2020, (Global Tuberculosis Report, WHO, 2021).

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

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

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

1.3. Resposta imune ao Mtb

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

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

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

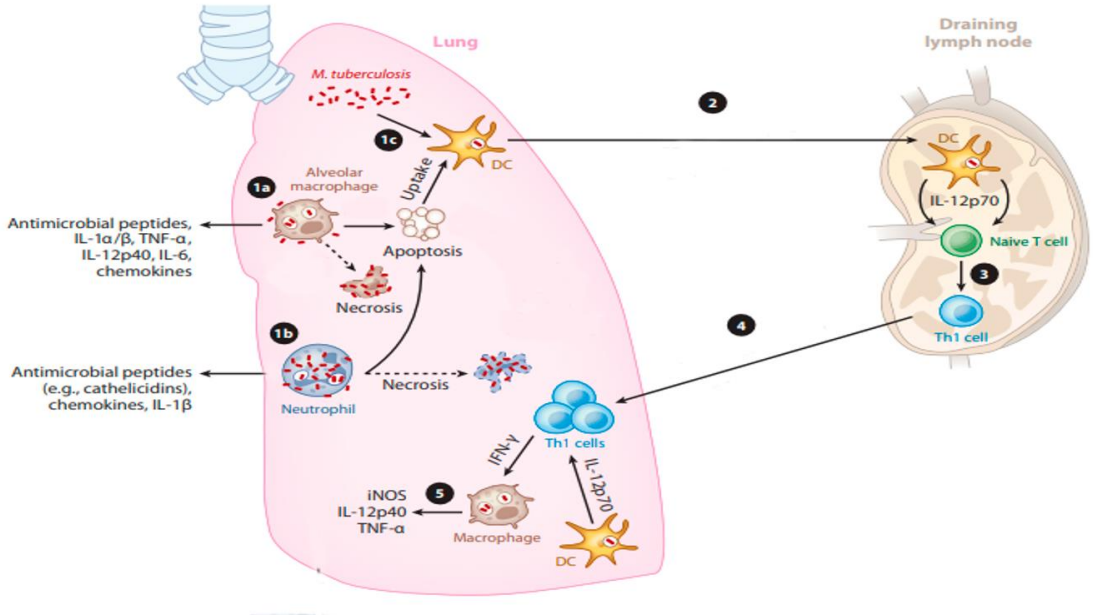

Figura 2. Resposta imune durante a infecção por Mtb (O'garra et al., 2013)

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

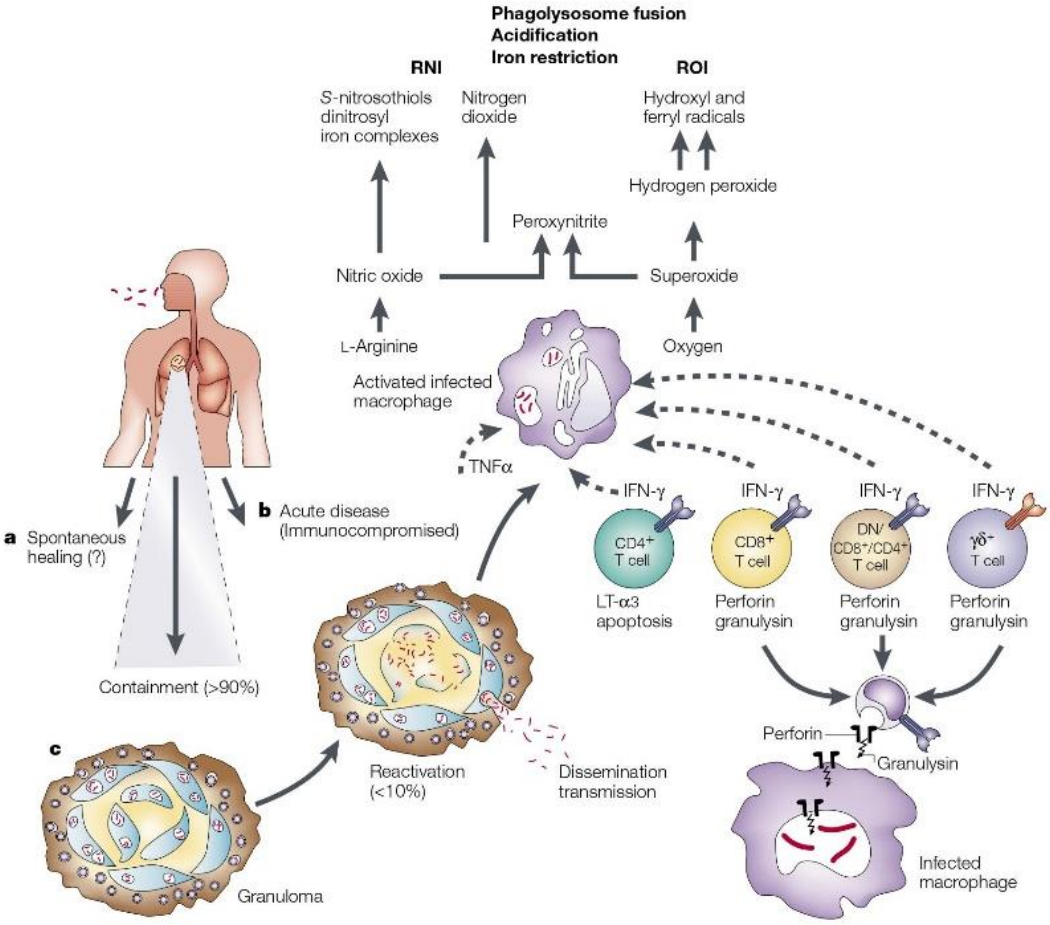

Figura 3. Principais características da tuberculose: da infecção à defesa do hospedeiro (Kaufmann et al., 2001).

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

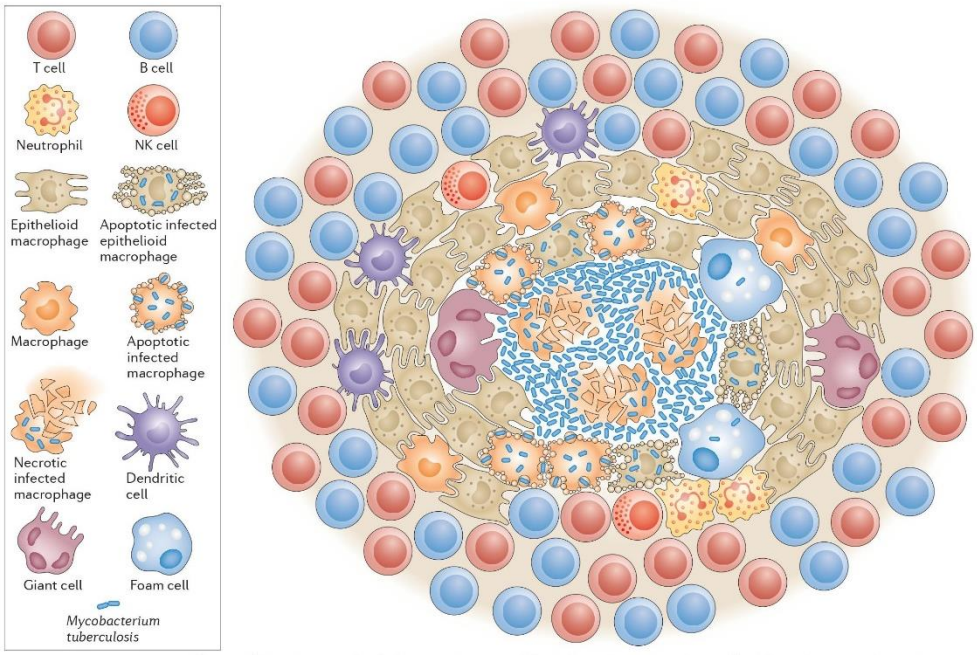

Figura 4. Estrutura e constituintes celulares do granuloma tuberculoso (Ramakrishnan et al., 2012)

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

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

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

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

1.4. Sinalização purinérgica

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

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

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

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

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

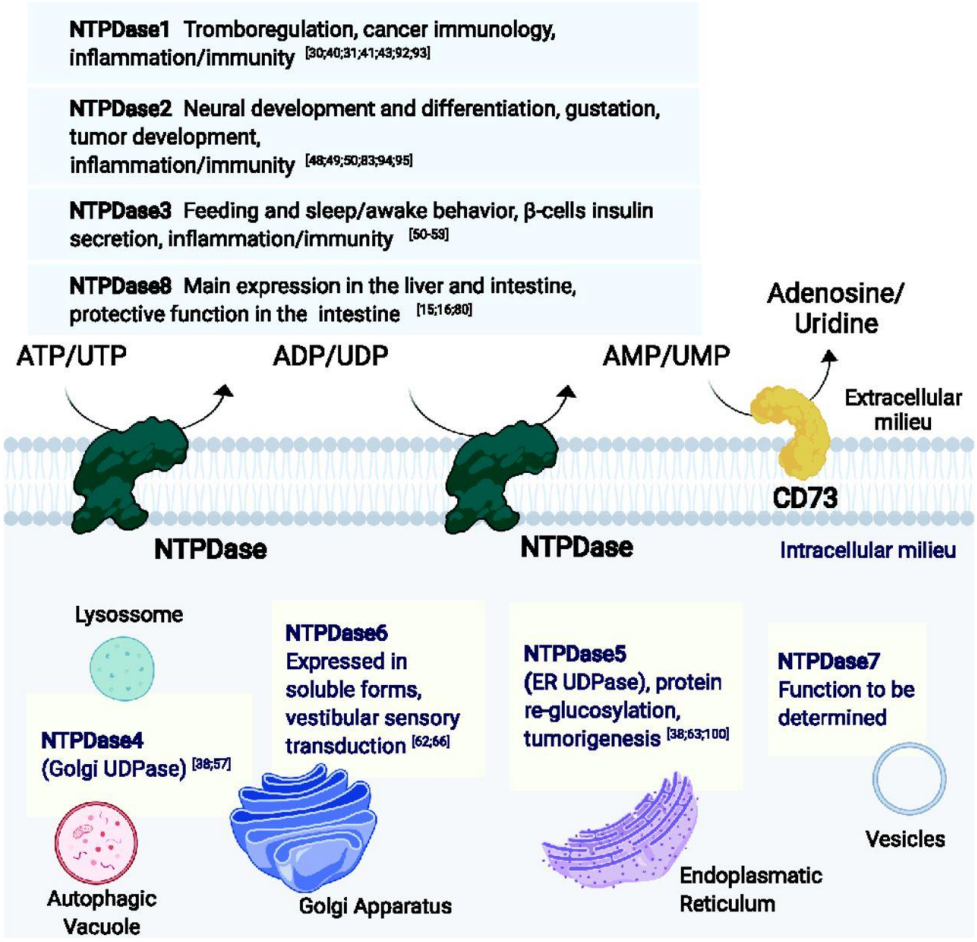

Figura 5. Localização celular e função dos isotipos da E-NTPDase. (Haas et. al., 2021)

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

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

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

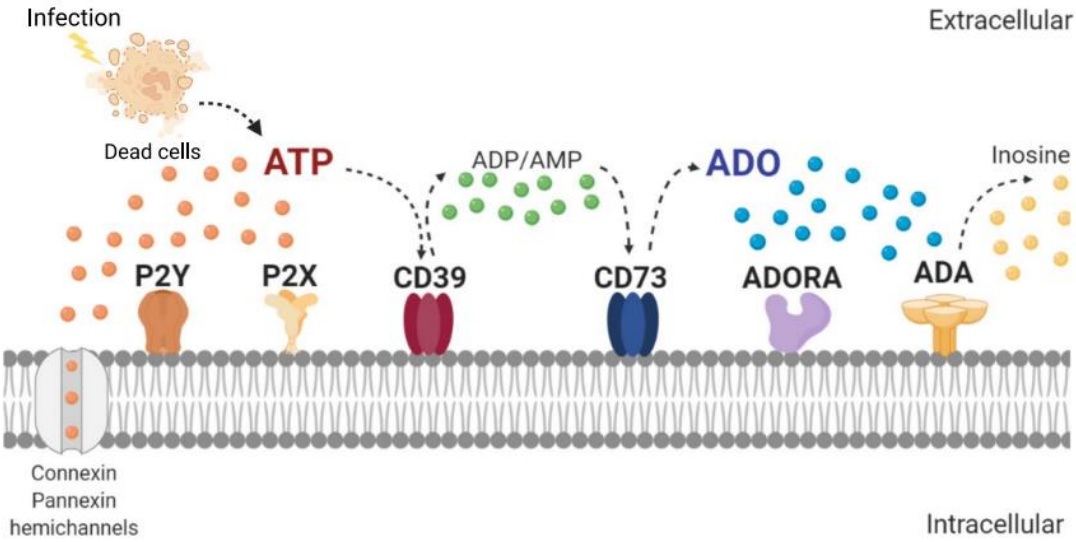

Figura 6. Proteínas de membrana e metabólitos da sinalização purinérgica (Eberhardt et al., 2022)

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

1.5. Regulação da resposta imune mediada pela atividade de CD39

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

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

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

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

1.6. Sinalização purinérgica da resposta imune durante a TB

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

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

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

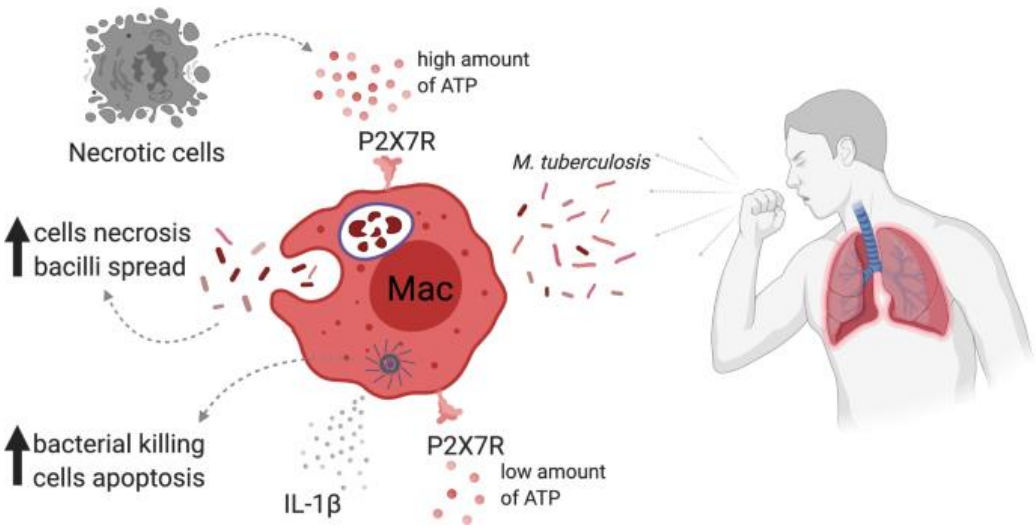

Figura 7. Papel dual do receptor P2RX7 na infecção por Mtb. (Eberhardt et al., 2022)

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

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

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

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

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

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

2.2. Objetivos específicos:

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

3. Material e métodos

3.1. Camundongos

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

3.2. Micobactérias e infecção

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

3.3. Procedimento de infecção dos camundongos

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

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

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

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

3.5. Isolamento e contagem de células infiltradas no pulmão

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

3.6. Análise fenotípica das células infiltradas no pulmão

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

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

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

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados

3.7. Análise macroscópica e microscópica do pulmão

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

3.8. Análise e contagem das UFC

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

3.9. Isolamento e cultura de MDMO

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

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

3.10. Infecção *in vitro* dos MDMO

Os MDMO foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços na concentração de $1x10^5$ células por poço. Alíquotas de micobactérias Mtb Beijing M299 foram descongeladas e cultivadas como descrito NO ITEM 3.2. As suspensões micobacterianas foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min e ressuspensas em meio PBS 1X. Em seguida, a suspensão micobacteriana foi sonicada por 30s e homogeneizada para dispersar os grumos. Após dispersão dos grumos, as micobactérias foram marcadas com CFSE por 20 minutos em estufa à 37ºC e em seguida lavadas 3x com PBS 1x com 10% de SFB. Os MDMOs foram expostos à infecção por Mtb Beijing M299 fluorescente com 1:10 MOI durante 3 horas de incubação. Após 3 horas de incubação com as micobactérias, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x em temperatura ambiente e depois mantidas em cultura em meio DMEM-F12 fresco, suplementado com 3% de SFB durante 24 horas. Após 24h de cultura, os sobrenadantes foram coletados para quantificação das UFC extracelulares e as células foram marcadas com Live and Dead por 20 minutos à 4ºC para avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo.

3.11. Análise estatística

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

4. Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Review.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Review.

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