RENAN SIQUEIRA

**IMPORTÂNCIA DO RECEPTOR P2X7 NO CONTROLE DA
POPULAÇÃO DE CÉLULAS T AUXILIARES FOLICULARES E NA
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS DURANTE A
MALÁRIA CAUSADA POR *Plasmodium chabaudi* E
*Plasmodium vivax***

São Paulo

2019

Renan Siqueira

Importância do receptor p2x7 no controle da população de células t
auxiliares foliculares e na produção de anticorpos específicos
durante a malária causada por *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium*
vivax

Tese de doutorado apresentada ao programa de
pós-graduação em imunologia do instituto de
ciências biomédicas, campus cidade universitária –
USP, como requisito parcial para obtenção do título
de doutor em ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Maria Regina D'Império Lima

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Siqueira, Renan

Importância do receptor p2x7 no controle da
população de células t auxiliares foliculares e na
produção de anticorpos específicos durante a malária
causada por Plasmodium chabaudi e Plasmodium vivax
/ Renan Siqueira; orientadora Maria Regina
D\'Império Lima. -- São Paulo, 2019.
146 p.

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

1. Malária. 2. P2X7R. 3. Células TFH. 4.
Anticorpos. 5. Polimorfismo genético. I. D\'Império
Lima, Maria Regina , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renan Siqueira

Título da Tese: Importância do receptor p2x7 no controle da população de células t auxiliares foliculares e na produção de anticorpos específicos durante a malária causada por *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium vivax*

Orientador: Maria Regina D'Império Lima

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Importância do receptor p2x7 na célula t helper folicular durante a infecção pelo plasmodium chabaudi chabaudi(as)*", registrado sob o protocolo nº **109/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **07/12/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Regina D'Imperio Lima**

- Membros da Equipe: **Renan Siqueira (Pós-graduando)**

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Importance of p2x7 receptor on t helper follicular cell during plasmodium chabaudi chabaudi (as) infection*", protocol nº **109/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/7/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Regina D'Imperio Lima**

- Team members: **Renan Siqueira (Graduate Student)**

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	334
	C57BL/6 (P2X7R-/-)	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	334

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS NO GENE QUE CODIFICA O RECEPTOR P2X7 EM PACIENTES COM MALÁRIA CAUSADA POR Plasmodium vivax EM MANAUS-AM

Pesquisador: Renan Siqueira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09807919.1.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.257.187

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem apresentado, a hipótese é viável e embasada em literatura pertinente. Os objetivos são claros e bem definidos. Os métodos e o planejamento experimental são adequados para atingir os objetivos propostos. Os critérios de inclusão e exclusão estão especificados, bem como os riscos e benefícios.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do projeto é avaliar o polimorfismo funcional de P2X7 com perda de função em pacientes com malária e correlacionar com a produção de anticorpos e manifestações clínicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos para os participantes serão mínimos pois haverá apenas retirada de pequena quantidade de sangue venoso (10 ml) realizada por profissional experiente. Poderá haver desconforto como dor e raramente hematoma no local da intervenção.

Benefícios: A participação neste projeto não tem objetivo de tratamento e não haverá nenhum benefício direto ao participante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante considerando que a malária é um importante problema de saúde pública mundial que ocorre em áreas tropicais e subtropicais. Como justificado pelos responsáveis

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br

pelo projeto "compreender a ativação e manutenção das células TFH na malária é de suma importância para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Esperam com o desenvolvimento deste projeto poder compreender melhor os mecanismos envolvidos na geração de anticorpos de alta afinidade na malária, bem como gerar novos conhecimentos com vistas a possíveis aplicações no desenvolvimento de vacinas." As células TFH são uma nova subpopulação de células T helper que são especializadas em auxiliar as células B na formação do centro germinativo, maturação de afinidade de anticorpos e geração de células B de memória. As células TFH, dentre as células T, são as que mais expressam P2X7, um receptor que está envolvido no processo de liberação de citocinas e morte celular. O gene que codifica o receptor P2X7 é altamente polimórfico apresentando em humanos pelo menos 11 polimorfismos de nucleotídeo único não sinônimo que leva a perda ou ganho de função. Pode haver perda de função em pacientes com malária e sua correlação com a produção de anticorpos e com as manifestações clínicas pode levar à compreensão dos mecanismos envolvidos na geração de anticorpos de alta afinidade na malária.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão adequados.

Recomendações:

Recomenda-se retirar o item 12 do TCLE que está incongruente com o último parágrafo do TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclui-se pela aprovação do projeto. Não foram encontradas pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br

USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.257.187

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1305806.pdf	08/03/2019 18:08:20		Aceito
Outros	Declaracao_local_de_Coleta.pdf	08/03/2019 18:07:45	Renan Siqueira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao.pdf	08/03/2019 18:06:51	Renan Siqueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	08/03/2019 18:06:29	Renan Siqueira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	08/03/2019 18:06:11	Renan Siqueira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/03/2019 18:05:07	Renan Siqueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 10 de Abril de 2019

Assinado por:
Camila Squarzon Dale
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LIDI) do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, e no Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA), da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Instituto Leônidas & Maria Deane (ILMD).

O presente projeto recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,

Jair & Beatriz, por sempre

Acreditarem em mim.

À minha irmã, Regiane,

E a meus irmãos pela amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida concedida, pois sem ela eu não estaria aqui; e pela força para essa longa jornada, que teve vários imprevistos - como quase tudo na vida.

Ao meu pai, irmãos e a toda minha família, em especial minha mãe que, com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha caminhada.

Agradeço a minha professora orientadora Maria Regina D'Império Lima, por ter aceito me orientar, pela paciência, e sem a qual seria impossível concluir este trabalho.

Ao Dr. José Maria Alvarez Mosig pelos anos de convivência e pelas experiências e conversas compartilhadas.

Ao Dr. Paulo Afonso Nogueira, por ceder seu laboratório para a realização dos experimentos em Manaus e por todo o suporte com a parte envolvendo humanos neste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, que gentilmente cedeu as amostras de DNA e soro humanos para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Mauricio Morishi Ogusku pelos ensinamentos e pela ajuda prestada nos bioensaios envolvendo análise de polimorfismo.

À professora Alessandra Pontillo, por seus ensinamentos ao longo das supervisões de minhas atividades na pós-graduação.

Aos professores que dispuseram um tempo de suas rotinas para participar da banca de defesa e por suas contribuições com o enriquecimento deste trabalho, meu muito obrigado.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia do Departamento de Imunologia, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no meu desenvolvimento profissional.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Maria, Isabella, Caio, Rafael Moisés, Rafael Torquato, Beatriz, Eduardo, Paulo, Dani, em especial a Érika e a Déborah pela amizade e pela ajuda prestada ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Rogério e Áurea, pelo suporte nos experimentos no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Imunologia e em especial à Sra. Eni pela ajuda durante todos meus anos de curso.

A todos os funcionários do Departamento de Imunologia, que sempre me ajudaram quando precisei.

À Fiocruz Amazônia, que me acolheu e permitiu a realização de uma parte desta tese em suas dependências, em especial à Elizangela, pelas risadas e ajuda nos experimentos na reta final deste trabalho.

ΕΠΙΓΡΑΦΕΣ

“A resposta certa não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.” (Mario Quintana)

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.” (Martin Luther King)

RESUMO

RESUMO

Siqueira, R. Importância do Receptor P2X7 no Controle da População de Células T Auxiliares Foliculares e na Produção de Anticorpos Específicos Durante a Malária Causada por *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium vivax*. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

A malária é um importante problema de saúde pública mundial que ocorre nas áreas tropicais e subtropicais da Terra. No Brasil, está praticamente restrita à região amazônica. A doença é causada por cinco espécies de protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Plasmodium*. A resposta imune protetora se desenvolve após repetidas exposições ao parasito, e os anticorpos desempenham um papel importante nessa proteção. As células T_{FH} são uma nova subpopulação de células T auxiliares especializadas em fornecer ajuda às células B para a formação do centro germinativo, maturação de afinidade de anticorpos e geração de células B de memória. As células T_{FH}, dentre as células T, são as que mais expressam o receptor P2X7 (P2X7R), um canal seletivo de íons que se ativa pelo ATP extracelular e está envolvido no processo de ativação e morte celular. Neste trabalho nós avaliamos o papel do P2X7R no controle da população de células T_{FH} do baço e na produção de anticorpos específicos durante a malária causada por *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium vivax*. Observamos que os camundongos P2X7R^{-/-} apresentavam um acúmulo precoce de células T_{FH} durante a infecção pelo *P. chabaudi*, com pico no 14º dia pós-infecção. A eliminação do parasito, através do tratamento com cloroquina, reduziu a quantidade de células T_{FH} no baço. Uma vez que a cloroquina, além de eliminar os parasitos, possui atividade imunossupressora, realizamos experimentos de cotransferência de células, para determinar a importância da expressão do P2X7R nas células CD4⁺ no controle dessa população. Verificamos que a ausência de P2X7R nas células CD4⁺ favoreceu o acúmulo de células T_{FH} *in vivo*, independentemente do microambiente. Em relação aos mecanismos envolvidos nesse processo, constatamos que a proliferação das células T_{FH} *in vivo* não foi influenciada pela presença do P2X7R. Confirmando resultados anteriores, observamos que o estímulo com

ATP induz o aumento da exposição de fosfatidilserina nas células T_{FH}. Além disso, o estímulo com ATP extracelular causou a morte das células T_{FH} do baço de maneira dependente de P2X7R. As células T_{FH} eram mais susceptíveis à morte celular mediada por ATP do que outras populações de células T. Por outro lado, a ativação das células T_{FH} geradas durante a infecção pelo *P. chabaudi* reduziu a sensibilidade à morte celular induzida por ATP e mediada pelo P2X7R. Finalmente, utilizando ensaio de cotransferência, comprovamos a importância do P2X7R expresso nas células T_{FH} na morte dessas células *in vivo*. O acúmulo de células T_{FH} no baço de camundongos P2X7R^{-/-} infectados estava associado à maior concentração no soro de anticorpos IgG2a totais e de alta avididade. A população de células B do centro germinativo, mas não de plasmócitos, também era maior no baço de camundongos P2X7R^{-/-} infectados. Em humanos, indivíduos infectados com *P. vivax* apresentando polimorfismos genéticos que levam à perda de função do P2X7R também apresentam maior concentração de anticorpos IgG3 específicos no soro. Este trabalho contribui para a compreensão do papel do receptor P2X7 na morte das células T_{FH} do baço e na aquisição de imunidade humoral durante a infecção pelo *P. chabaudi* e *P. vivax*.

Palavras-chave: Malária, ATP, P2X7R, Células T_{FH}, Morte celular, Anticorpos, Polimorfismo genético

ABSTRACT

ABSTRACT

Siqueira, R. Importance of the P2X7 Receptor in the Control of Follicular Helper T Cells and the Production of Specific Antibodies During Malaria Caused by *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium vivax*. [Thesis (PhD in Immunology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2019.

Malaria is a major global public health problem that occurs in the tropical and subtropical areas of the Earth. In Brazil, it is practically restricted to the Amazon region. Malaria is caused by five species of protozoan parasites belonging to the genus *Plasmodium*. The protective immune response develops after repeated exposure to the parasite, and antibodies play an important role in this protection. T_{FH} cells are a new subpopulation of helper T cells specialized in helping B cells in germinal center formation, antibody affinity maturation, and memory B cell generation. T_{FH} cells are within T cells the ones that most express the P2X7 receptor (P2X7R), a selective ion channel that is activated by extracellular ATP and is involved in the process of cell activation and death. In this study, we evaluated the role of P2X7R in the control of T_{FH} cells in the spleen and in the production of specific antibodies during malaria caused by *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium vivax*. We observed that P2X7R^{-/-} mice had an early accumulation of T_{FH} cells during *P. chabaudi* infection, with a peak on the fourteenth day after infection. The elimination of the parasite with chloroquine treatment reduced the T_{FH} cell population in the spleen. Since chloroquine has immunosuppressive activity, besides eliminating parasites, we performed cell co-transfer experiments to determine the importance of P2X7R expression in CD4⁺ cells in the control of this population. We found that the absence of P2X7R in CD4⁺ cells favored the accumulation of T_{FH} cells *in vivo* regardless of the microenvironment. With regard to the mechanisms involved in this process, we found that the presence of P2X7R did not influence the proliferation of T_{FH} cells *in vivo*. Agreeing with previous results, we found that ATP stimulation induces increased exposure of phosphatidylserine in T_{FH} cells. Furthermore, the stimulus with extracellular ATP caused the P2X7R-dependent death of T_{FH} cells in the spleen. T_{FH} cells were more susceptible to ATP-

mediated cell death than other T cells. Conversely, the activation of T_{FH} cells generated during *P. chabaudi* infection reduced the sensitivity to ATP-induced and P2X7R-mediated cell death. Finally, using co-transfer assay, we demonstrated the importance of P2X7R expressed in T_{FH} cells in the death of these cells *in vivo*. The accumulation of T_{FH} cells in the spleen of infected P2X7R^{-/-} mice was associated with a higher concentration of total and high-avidity IgG2a antibodies in serum. The population of B cells in the germination center, but not of plasma cells, was higher in the spleen of infected P2X7R^{-/-} mice. In humans infected with *P. vivax*, the presence of genetic polymorphism leading to loss of P2X7R function was associated with a higher concentration of specific IgG3 antibodies in serum. This study contributes to understand the role of the P2X7 receptor in the death of T_{FH} cells in the spleen and the development of humoral immunity during infection by *P. chabaudi* and *P. vivax*.

Keywords: Malaria, ATP, P2X7R, T_{FH} cells, Cell death, Antibodies, Genetic polymorphism

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais subtipos de receptores P2X.....	51
Tabela 2. Principais polimorfismos de nucleotídeo único do gene <i>P2RX7</i>	55
Tabela 3. Frequência genotípica e alélica de pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i> e polimorfismo genético de P2X7R.....	86

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1- Situação da malária na América do Sul.....	36
Ilustração 2- Ciclo biológico dos <i>Plasmodium</i> spp no hospedeiro vertebrado.....	38
Ilustração 3- Mecanismos efetores dos anticorpos na malária.....	49
Ilustração 4- Representação esquemática da ação do receptor P2X7 na geração de anticorpos de alta afinidade na malária.....	99

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cinética das células T _{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R ^{-/-} durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	68
Figura 2. Células T _{FH} no dia 50 pós infecção com <i>P. chabaudi</i>	69
Figura 3. Efeitos do tratamento com cloroquina na população de células T _{FH} esplênicas de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i> ..	71
Figura 4. Análise das células CD4 ⁺ do baço de camundongos CD45.1 e P2X7R ^{-/-} cotransferidas para camundongos CD4 ^{-/-} infectados pelo <i>P. chabaudi</i>	72
Figura 5. Expressão de Ki67 nas células T _{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R ^{-/-} infectados pelo <i>P. chabaudi</i>	74
Figura 6. Exposição de fosfatidilserina nas células T _{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R ^{-/-} infectados com <i>P. chabaudi</i> , estimulados ou não com ATP.....	75
Figura 7. Avaliação da morte das células T _{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R ^{-/-} infectados, estimulados ou não com ATP.....	77
Figura 8. Efeitos da estimulação com eritrócitos parasitados na viabilidade das células CD4 ⁺ e T _{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R ^{-/-} infectados com <i>P. chabaudi</i>	80
Figura 9. Análise da morte celular <i>in vivo</i> em células T _{FH} geradas durante a infecção pelo <i>P. chabaudi</i> que expressam ou não P2X7R.....	81
Figura 10. Produção de IgG2a anti- <i>P. chabaudi</i> total e de alta avidéz nos camundongos P2X7R ^{-/-} e C57BL/6 durante infecção por <i>P. chabaudi</i>	83
Figura 11. Células B do centro germinativo e plasmócitos nos camundongos P2X7R ^{-/-} e C57BL/6 durante infecção por <i>P. chabaudi</i>	85
Figura 12. Dosagem de anticorpos anti-PvMSP1 ICB2-5 em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	88
Figura 13. Dosagem de anticorpos anti-PvMSP1 ₁₉ em pacientes com malária causada pelo <i>P. vivax</i>	90

LISTA DE ABREVIATURAS E
SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α – alpha

β – beta

γ – gama

μ – micron

Ca – Cálcio

K – Potássio

Na – Sódio

-/- – nocaute

- **A** – Adenina
- **Ala** – Alanina
- **ACT** – Sigla do inglês, *artemisinin-based combination therapies*
- **ADP** – Adenosina difosfato
- **AMP** – Adenosina monofosfato
- **ANOVA** – Análise de variância
- **APC**- Célula apresentadora de antígeno
- **APC-Cy7**- Alofocianina-Cy7
- **ATP** – Adenosina Trifosfato
- **Bcl-6** - Proteína 6 do linfoma de células B
- **Blimp-1** – Proteína de maturação de linfócitos B
- **BSA** - Albumina Sérica Bovina
- **C** – Citosina
- **Caspase** – Sigla do inglês, *cysteine-aspartic-acid-proteases*
- **CCR7** - Receptor de quimiocina C-C tipo 7
- **CD** – Grupos de diferenciação
- **CSP** – Sigla do inglês, *Circumsporozoite protein*
- **CXCR5** - Receptor de quimiocina C-X-C tipo 5
- **DAMP** – Padrão molecular associado ao dano
- **DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- **ELISA** – Sigla do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*
- **EP** – Eritrócito parasitado
- **FITC** – Isotiocianato de Fluoresceína
- **FMO** – Sigla do inglês, *Fluorescence Minus One*
- **FoxP3** – Sigla do inglês, *forkhead box P3*
- **Glu** – Glutamato
- **G** – Guanina
- **HIV** – Sigla do inglês, *Acquired Immune Deficiency Syndrome*
- **ICOS** - Coestimulador de Células T Induzível
- **IFN** – Interferon
- **Ig** - Imunoglobulina
- **IL**- Interleucina
- **i.p.** –Intraperitoneal

- **IPT** – Sigla do inglês, *Intermittent Preventive Treatment*
- **iRBC** - Eritrócito parasitado
- **IRS** – Sigla do inglês, *Indoor residual spraying*
- **ITN** – Sigla do inglês, *Insecticide-treated mosquito nets*
- **Ki67** – Sigla do inglês, *Marker Of Proliferation Ki-67*
- **kg** – Quilograma
- **L** – Ligante
- **L /D** – Sigla do inglês, *LIVE/DEAD*
- **MFI** – Média de intensidade de fluorescência
- **MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade
- **mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro
- **mg** – Miligrama
- **M** – Molar
- **mM** – Milimolar
- **μM** – Micromolar
- **nm** – Nanômetro
- **NK** – Sigla do inglês, *Natural Killer cell*
- **NKT** – Sigla do inglês, *Natural Killer T cell*
- **NLRP3** – Sigla do inglês, *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
- **p . i.** – pós infecção
- **PAMP** - Padrão molecular Associado a Patógenos
- **PBS** – Tampão fosfato salino
- **PCR** – Sigla do inglês, *Polymerase Chain Reaction*
- **PD1** - Proteína de morte celular programada 1
- **PE**- Ficoeritrina
- **PE-Cy7** - Ficoeritrina-Cy7
- **PerCp** - Complexo proteína clorofila peridina
- **PI** – Iodeto de propídio
- **PS** – Fosfatidilserina
- **P2X7R** – Sigla do inglês, *P2X Purinergic Receptors 7*
- **R** – Receptor
- **RPMI** – Meio McCoy de cultura modificado
- **STAT** – Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
- **Ser** – Serina
- **SNP** – Sigla do inglês, *single nucleotide polymorphism*
- **T** – Timina
- **TCR** – Receptor de célula T
- **Th** – Célula T auxiliar
- **T_{FH}** – Célula T Auxiliar Folicular
- **T_{FR}** – Células T Folicular Reguladora
- **T_R ou T_{REG}** – Célula T Reguladora
- **TGF-β** – Fator transformador de crescimento beta
- **TLR** - Receptor do tipo *Toll*
- **Thr** – Treonina
- **TMB** – Tetrametilbenzidina
- **TNF α** - Fator de Necrose Tumoral α
- **WHO** – do inglês, *World Health Organization*

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	34
1.1 Aspectos Gerais da Malária	35
1.1.1 A malária no Mundo e no Brasil	35
1.1.2 Ciclo Biológico do Plasmódio no Hospedeiro Vertebrado	37
1.1.3 Manifestações Clínicas	38
1.1.4 Tratamento e Profilaxia	40
1.1.5 Modelos de Malária Murina	41
1.2 Mecanismos Efetores da Resposta Imune à Malária	42
1.2.1 Células T _{FH} e Malária	44
1.2.2 Anticorpos na malária	47
1.3 Receptores Purinérgicos e o Sistema Imune	49
1.3.1 A Importância do P2X7R no Sistema Imune	52
1.3.2 Polimorfismos no Gene <i>P2RX7</i> Humano	54
2. OBJETIVOS	56
2.1 Objetivo Geral	57
2.2 Objetivos Específicos	57
3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1 Animais, Parasitos, Infecção e Tratamento	59
3.2 Sujeitos Amostrais	59
3.3 Análise Fenotípica das Células T _{FH}	60
3.4 Transferência Adotiva de Células CD4 ⁺	60
3.5 Expressão de Proteínas Heterólogas	61

3.6 ELISA.....	62
3.7 ELISA de Avidéz.....	63
3.8 Análise de Polimorfismo de Nucleotídeo Único.....	63
3.9 Análise Estatística.....	63
3.10 Considerações Éticas.....	64
4. RESULTADOS.....	65
4.1 A ausência de P2X7R leva ao acúmulo precoce de células T_{FH} no baço de camundongos infectados com <i>P. chabaudi</i>.....	66
4.2 O tratamento com cloroquina reduz o acúmulo de células T_{FH} no baço de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>.....	70
4.3 A expressão do P2X7R nas células T CD4⁺ favorece o acúmulo de células T_{FH} independentemente da carga parasitária.....	72
4.4 A deficiência do P2X7R não influencia a proliferação das células T_{FH} esplênicas durante a infecção com <i>P. chabaudi</i>.....	73
4.5 O estímulo com ATP <i>in vitro</i> induz a exposição de fosfatidilserina nas células T_{FH} esplênicas geradas na infecção com <i>P. chabaudi</i> de modo dependente do P2X7R.....	75
4.6 As células T_{FH} geradas durante a infecção com <i>P. chabaudi</i> são particularmente propensas a morrer de modo dependente do P2X7R....	76
4.7 A estimulação com eritrócitos parasitados aumenta a porcentagem de células T_{FH} <i>in vitro</i>.....	78
4.8 A expressão do P2X7R nas células T_{FH} promove a morte <i>in vivo</i> destas células durante a infecção com <i>P. chabaudi</i>.....	80
4.9 Acúmulo de células T_{FH} no baço de camundongos P2X7R^{-/-} está relacionado com maior concentração de anticorpos IgG2a totais e de alta afinidade pelo parasito no soro.....	82

4.10 A ausência de P2X7R leva ao aumento do número de células B do centro germinativo, mas não afeta a população de plasmócitos no baço de camundongos infectados com <i>P. chabaudi</i>	84
4.11 Polimorfismos de Nucleotídeo Único que alteram a função de P2X7R estão relacionados com maior quantidade de anticorpos na malária humana.....	86
5. DISCUSSÃO.....	91
6. CONCLUSÃO.....	100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
APÊNDICE	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Malária

Paludismo, impaludismo, febre palustre, maleita, sezão ou malária, todos usados como sinônimos para descrever uma doença que acomete o homem e cuja história remonta a tempos antigos. Neste trabalho, adotamos o nome malária que significa, literalmente, ar ruim (mal-aria), devido à crença popular de que a doença era causa por vapores ruins exalados dos pântanos (BRAGA & FONTES, 2011). Há relatos de que esta doença já era conhecida desde 2700 A.C. pelos chineses. Por muitos séculos a malária tem sido uma doença mortal, com grande morbidade, impactando profundamente a situação econômica e social em diversos países endêmicos (AZIZI & BAHADORI, 2013). Embora já fosse uma doença humana conhecida há muitos anos, seu agente etiológico só foi identificado no fim do século XIX. Atualmente, sabemos que a malária humana é causada por cinco espécies de parasitos pertencentes ao gênero *Plasmodium*. Das quais, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* são espécies transmitidas de uma pessoa à outra pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Recentemente, tem sido reportado que o *Plasmodium knowlesi*, espécie originalmente associada à malária em macacos, também infecta humanos, mas a transmissão ocorre de forma zoonótica (WHO, 2016).

1.1.1 A Malária no Mundo e no Brasil

A malária é um grave problema de saúde pública global, sendo endêmica em cerca de 87 países e territórios. As principais áreas endêmicas encontram-se na África sub-saariana, na América do Sul, em Ilhas do Pacífico e em países do sudeste Asiático. Em 2017, estimou-se a ocorrência de 219 milhões de casos de malária e 435 mil mortes no mundo (WHO, 2018). O *P. vivax* é a espécie que apresenta maior distribuição geográfica devido à capacidade de se desenvolver em clima subtropical, sendo assim a mais prevalente fora da África. Na África, o *P. falciparum* é a espécie mais prevalente correspondendo a 99% dos casos, que são responsáveis pela maioria das mortes causadas pela malária no mundo (WHO, 2017).

Nas Américas a malária está presente em 18 países com aproximadamente 560 mil casos e 110 mortes registradas em 2016. As principais áreas de transmissão encontram-se no Brasil, na Colômbia, no Peru e na Venezuela, que juntos representam mais de 80% dos casos de malária nas Américas (WHO, 2017). A ilustração 1 mostra a situação da malária na América do Sul.

Fonte: adaptado de World Malaria Report, 2017

Ilustração 1- Situação da malária na América do Sul. Casos confirmados de malária por mil habitantes em 2016. As cores representam: branca ausência de casos confirmados no período; cinza de 0.1 a 1; marrom-claro de 1 a 50; marrom-intermediário de 50 a 100 e marrom-escuro mais de 100 casos por mil habitantes.

No Brasil, dados do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (Sivep) apontam que a maioria dos casos notificados de malária está concentrada na região Amazônica. Os estados do Acre e Amazonas apresentam quase a metade dos casos malária no Brasil (WHO, 2017). Nas regiões extra-amazônicas, apesar de poucas notificações, a doença não deve ser negligenciada, pois se observa maior letalidade que na região endêmica

devida à dificuldade de diagnóstico. Em 2015, foram registrados cerca de 143 mil casos de malária no Brasil e 35 mortes (BRASIL, 2018).

Das cinco espécies associadas à malária, apenas três estão presentes de forma autóctone no Brasil: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (BRASIL, 2018). Não havendo, portanto, até o presente transmissão de *P. ovale* e *P. knowlesi* que são espécies restritas a algumas regiões da África e do sudeste asiático, respectivamente. O *P. vivax* é a espécie mais prevalente, correspondendo a mais de 80% dos casos notificados (BRASIL, 2018). Na Amazônia, a prevalência de casos de malária é maior na população adulta e casos de complicações associadas à doença têm sido relatados (OLIVEIRA-FERREIRA, 2010).

1.1.2 Ciclo Biológico do Plasmódio no Hospedeiro Vertebrado

A infecção do hospedeiro vertebrado inicia-se pela inoculação dos esporozoítos na pele pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Após a inoculação, os esporozoítos alcançam a corrente sanguínea e ao atingirem o fígado infectam os hepatócitos, onde se dividem por esquizogonia. O ciclo pré-eritrocítico, também chamado de fase hepática, é totalmente assintomático e dura de 7-10 dias em humanos, dependendo da espécie, e cerca de 2 dias em camundongos. Ao final desta fase, os merozoítos liberados na corrente sanguínea infectam eritrócitos, dando início à fase sanguínea do parasitismo que é responsável pela sintomatologia da doença (WHO, 2014). Historicamente, na malária causada por *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítos podem permanecer no fígado por algumas semanas, meses e até mesmo anos em uma forma dormente chamada de hipnozoíto que é responsável pela recaída, característica típica da malária causada por estas espécies (MARKUS, 2015). A ilustração 2 mostra o ciclo de vida dos plasmódios no hospedeiro vertebrado.

Fonte: adaptado de Lee, Symington e Fidock, 2014.

Ilustração 2. Ciclo biológico dos *Plasmodium spp* no hospedeiro vertebrado.

1.1.3 Manifestações Clínicas

Os sintomas apresentados por indivíduos com malária são comuns a outras doenças infecciosas e incluem: febre alta, dor de cabeça, náuseas e dores musculares. Estes sintomas desaparecem em poucos dias se administrado o tratamento adequado. Em pessoas não tratadas podem ocorrer complicações da doença que incluem manifestações isoladas ou em conjunto de três síndromes: respiratória, malária cerebral e anemia (COWMAN et al., 2016). Em mulheres grávidas observa-se também a malária placentária (FRIED e DUFFY, 2017).

As manifestações clínicas são diferentes dependendo da espécie envolvida. O *P. vivax* invade preferencialmente eritrócitos imaturos, enquanto *P. falciparum* é menos seletivo podendo causar parasitemias mais elevadas

(WHITE et al., 2014). No passado, a malária causada por *P. vivax* era descrita como uma doença branda caracterizada pela baixa letalidade. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que, em alguns casos, a infecção pelo *P. vivax* pode causar complicações com risco de morte semelhante à infecção pelo *P. falciparum* (ANSTEY et al., 2009; BAIRD, 2013).

A malária cerebral, uma complexa síndrome neurológica, é a principal causa de morte da malária causada por *P. falciparum*. O mecanismo envolvido nesta síndrome ainda não foi completamente elucidado. Porém, é bem estabelecida a participação de dois fatores distintos, não excludente: a expressão de proteínas do parasito na membrana dos eritrócitos, as chamadas PfEMP1 (Sigla do inglês, “Proteins of the *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1”), que são responsáveis pelo sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral; e a liberação de mediadores inflamatórios pelas células do endotélio vascular que leva ao aumento da permeabilidade vascular e consequentemente a formação do edema cerebral (WASSMER e GRAU, 2017).

A malária placentária ocorre em mulheres gestantes, especialmente na primeira gravidez, nas infecções causadas por *P. falciparum*. O fenômeno se inicia com a adesão dos eritrócitos parasitados à placenta, seguida pelo infiltrado de células, particularmente, macrófagos que são responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias. A exacerbação da inflamação na placenta está relacionada com baixo peso ao nascer e morte neonatal ou na infância (FRIED e DUFFY, 2017).

A síndrome respiratória é outra complicação possível na malária, e é comumente associada às infecções causadas por *P. falciparum*, embora também possa ocorrer em infecções por *P. vivax* e *P. knowlesi* (WHITE et al., 2014). A patogênese da síndrome respiratória não é total compreendida, mas parece que o sequestro dos eritrócitos parasitados na microcirculação pulmonar e a resposta inflamatória induzida pelo sistema imune do hospedeiro estão envolvidos (TAYLOR et al., 2012).

A anemia é uma das principais complicações associadas à malária causada por *P. vivax* e frequentemente está relacionada a recaídas ou

infecções crônicas devido à resistência de algumas cepas ao tratamento (WHITE et al., 2014). Como o *P. vivax* infecta preferencialmente os reticulócitos, a presença contínua do parasito pode destruir a maioria destas células impedindo a renovação da população de eritrócitos, o que leva ao quadro de anemia acentuada dentro de alguns meses (NAING et al., 2014).

1.1.4 Tratamento e Profilaxia

A malária é uma doença tratável e quando o tratamento é administrado de maneira correta as chances de curas são elevadas. O objetivo primário do tratamento visa a eliminação completa do parasito da corrente sanguínea e a prevenção de complicações e mortes. De modo geral o tratamento depende da espécie de plasmódio envolvida e da presença ou não de complicações (WHO, 2015).

Nos casos de malária não complicada causada por *P. falciparum* e *P. knowlesi*, a recomendação da Organização Mundial da Saúde é o uso de combinações terapêuticas à base de artemisinina – ACTs (Sigla do inglês, “artemisinin-based combination therapies”). O uso combinado de dois princípios ativos com mecanismos de ação diferentes faz das ACTs, hoje, o antimalárico mais eficaz disponível no mercado (WHO, 2016). Nos casos de malária não complicada causada por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, a cloroquina ainda é o tratamento de primeira escolha, contudo, tem sido descrito algumas cepas de *P. vivax* resistentes a esta droga (ASHLEY e PHYO, 2018). O uso de primaquina via oral é recomendado associado à cloroquina nos casos de infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, na intenção de prevenir as recaídas típicas destas espécies (WHO, 2014). O tratamento dos casos de malária complicada é feito através da administração intramuscular ou intravenosa de artesunato injetável, seguida de um tratamento à base de ACTs assim que o paciente estiver apto a tomar medicamento via oral (WHO, 2014).

As estratégias para a erradicação e o controle da malária geralmente estão focadas na prevenção por meio de redução da população de vetores ou na proteção de grupos de alto risco, como por exemplo, mulheres durante o período gestacional e crianças menores de 5 anos de idade. A maioria dos

programas nacionais de prevenção da malária utiliza campanhas de distribuição em massa de redes mosquiteiras tratadas com inseticida – ITNs (Sigla do inglês, “Insecticide-treated mosquito nets”). Nos últimos quinze anos, mais de 660 mil casos de malária foram evitados na África subsariana e cerca de 73% destes casos foram atribuídos à distribuição de ITNs (WHO, 2015). A borrifação intradomiciliar com inseticidas com efeito residual – IRS (Sigla do inglês, “Indoor residual spraying”) foi a principal estratégia da campanha global de erradicação da malária que resultou na eliminação da malária em muitos países e na redução em outros (WHO, 2015).

A quimioprevenção é indicada em mulheres grávidas após o terceiro trimestre de gestação que visitem países de alto risco de infecção. Na África subsariana, a maioria dos países empregam o uso de Tratamento Preventivo Intermitente – IPT (Sigla do inglês, “Intermittent Preventive Treatment”) em gestantes com o uso de pirimetamina sulfadoxina (WHO, 2017). No Brasil, a quimioprevenção não é recomendada devido à baixa incidência parasitária anual, à ampla distribuição da rede de diagnóstico e tratamento para malária e ao predomínio de *P. vivax* em toda a área endêmica, sendo que a eficácia da quimioprevenção para esta espécie de *Plasmodium* é baixa (BRASIL, 2008).

Uma vacina representa um avanço no controle e prevenção contra malária. Atualmente, RTS,S/AS01 (chamada “RTS,S”) é a mais importante e avançada vacina contra malária. Estudos clínicos demonstram que a vacina é capaz de proteger crianças tanto de malária clínica como também das complicações na malária. Porém, a eficácia de proteção varia entre 20 a 30% dependendo da idade (AGNANDJI et al., 2011; WHO, 2016).

1.1.5 Modelos de Malária Murina

Para o desenvolvimento de vacinas e novas estratégias terapêuticas é indiscutível a importância de modelos animais para estudos pré-clínicos. Além disso, embora existam diferenças entre os plasmódios de humanos e roedores no nível celular e genômico; não deixa de ser claro que grande parte dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune à malária humana foi inicialmente descrita usando modelos de malária murina. Os plasmódios de

roedores possuem significativa semelhança genética e fenotípica com os plasmódios humanos (WALLIKER, CARTER e MORGAN, 1971). A utilização de modelos murinos nos permite controlar a variabilidade genética do hospedeiro e parasito, bem como variáveis como idade, sexo e meio ambiente. As principais espécies de *Plasmodium* usadas como modelo de malária experimental são: *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium berghei* e *Plasmodium chabaudi*.

O *P. chabaudi* é uma espécie não letal em camundongos C57BL/6, que causa parasitemia elevada ao redor de uma semana após a infecção, seguida por baixos níveis do parasito que podem perdurar por mais de dois meses (LI, SEIXAS e LANGHORNE, 2001; LAMB et al., 2006). Esta espécie murina destaca-se como um modelo de malária por produzir uma doença que se assemelha em vários aspectos à causada por *P. vivax* e *P. falciparum* em humanos; apresentando febre, esplenomegalia, sequestro microvascular e indução de infecção crônica. Sendo assim, este modelo é considerado robusto para estudar os mecanismos da resposta imune à malária e sua regulação nas fases aguda e crônica da infecção (LI, SEIXAS e LANGHORNE, 2001; STEPHENS et al., 2012). Vale ressaltar, no entanto, que algumas síndromes associadas à malária humana não são observadas na infecção pelo *P. chabaudi*. Assim, por exemplo, o *P. berghei* é um modelo murino utilizado para o estudo da malária cerebral e placentária (cepa ANKA) em camundongos BALB/c (MARINHO et al., 2009), e a síndrome respiratória é avaliada utilizando essa mesma espécie (cepa ANKA) em camundongos DBA/2 (EPIPHANIO et al., 2010).

1.2 Mecanismos Efetores da Resposta Imune à Malária

A imunidade à malária é difícil de adquirir quer seja via exposição natural ou através de vacinação (SOON e HAQUE, 2018). A aquisição de imunidade à malária em condições naturais ocorre apenas após exposições repetidas ao parasito (MARSH e KINYANJUI, 2006). Ainda assim, a imunidade adquirida é suficiente para manter a parasitemia sub-microscópica e proteger os indivíduos de malária clínica, mas não para erradicação do parasito (MALES, GAYE, e

GARCIA, 2008). Além disso, foi mostrado na malária causada por *P. vivax* que exposições repetidas aos parasitos promovem a imunomodulação, o que previne de complicações da doença (CHAVES et al., 2016).

As células T CD4⁺ têm um papel importante na imunidade contra o plasmódio. Durante a fase eritrocítica, a produção de IFN- γ pelas células T_{H1} auxilia no controle dos merozoítas e eritrócitos infectados, tanto em camundongos quanto em humanos, promovendo a ativação de células fagocíticas (PEREZ-MAZLIAH e LANGHORNE, 2015). As células T CD4⁺ também são importantes no modelo experimental de malária causada pelo *P. yoelii*, por cooperar na ativação de linfócitos T CD8⁺ específicos (CARVALHO et al., 2002). As células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ exercem um papel fundamental na defesa do hospedeiro na fase pré-eritrocítica da malária, pois são capazes de eliminar os hepatócitos parasitados (BELACHEW, 2018).

As células T_{H2} foram primeiramente descritas durante a infecção por *P. falciparum* e *P. chabaudi*, como sendo importantes para controlar a fase crônica da doença, pois auxiliariam as células B na produção de anticorpos por meio da produção de IL-4 (LANGHORNE et al., 1989; TROYE-BLOMBERG et al., 1990). Porém, atualmente, estes mesmos autores acreditam que as células T_{H2} não são importantes para ajudar as células B na produção de anticorpos, um papel que foi atribuído a uma população especializada de células T CD4⁺ como veremos a seguir (PEREZ-MAZLIAH e LANGHORNE, 2015).

No primeiro contato com o antígeno, as células B proliferam e diferenciam rapidamente em plasmócitos que produzem anticorpos. Estes anticorpos produzidos são de baixa afinidade e a maioria das células B ativadas acaba morrendo por apoptose (SMITH et al., 1996). Uma pequena parcela destas células migra para os folículos linfóides secundários, onde dão início à formação do centro germinativo. No centro germinativo, estas células passam por um processo de mudança de classe e maturação de afinidade dos anticorpos, que acaba por melhorar consideravelmente a capacidade efetora destas moléculas (MANZ, THIEL e RADBRUCH, 1997).

Estudos recentes demonstram a complexidade do processo de diferenciação das células T CD4⁺ durante o estágio sanguíneo do parasitismo pelos

plasmódios, com o desenvolvimento de células T_{H1} e T_{H17} que diferem do modelo original bifásico T_{H1}/T_{H2} (SOON e HAQUE, 2018). Atualmente, com a identificação de novas subpopulações de células T $CD4^+$, o simples paradigma T_{H1}/T_{H2} não é suficiente para explicar a complexidade de ativação das células T na malária (PEREZ-MAZLIAH e LANGHORNE, 2015). Mais recentemente uma nova população de células T $CD4^+$ produtoras de IL-21 foi descrita (SCHAERLI et al., 2000; BREITFELD et al., 2000). As células T auxiliares foliculares - T_{FH} (do inglês, “follicular helper T cells”) são uma nova subpopulação de células T auxiliares especializadas em direcionar as respostas de células B (CROTTY, 2011). Vários estudos recentes mostram que as células T_{FH} têm um papel central na proteção contra a malária (OBENG-ADJEI et al., 2015; PÉREZ-MAZLIAH et al., 2015 e 2017; FIGUEIREDO et al., 2017).

1.2.1 Células T_{FH} e Malária

A produção de anticorpos contra a maioria dos antígenos requer interação entre as células B e células T auxiliares cognatas (MA et al., 2012). As células T_{FH} são essenciais para a formação do centro germinativo, maturação de afinidade dos anticorpos e geração de células B de memória (CROTTY, 2014). As células T_{FH} foram descritas pela primeira vez no ano 2000 como uma subpopulação de células T $CD4^+$ presente nas tonsilas humanas que expressam o receptor de quimiocina C-X-C tipo 5 - CXCR5 (Sigla do inglês, “C-X-C chemokine receptor type 5”) (SCHAERLI et al., 2000; BREITFELD et al., 2000).

Além do CXCR5, várias outras moléculas são associadas ao perfil T_{FH} . As células T_{FH} expressam altos níveis da proteína de morte celular programada 1 - PD-1 (Sigla do inglês, “Programmed cell death-1”) (LOCCI et al., 2013), co-estimulador de células T induzível - ICOS (Sigla do inglês, “inducible costimulator”), (CROTTY, 2011) e CD40 ligante - CD40L (do inglês, “CD40 ligand”) (VAN ESSEN, KIKUTANI e GRAY, 1995). Estas moléculas se ligam em PD1L, ICOSL e CD40, respectivamente. Em camundongos, as células T_{FH} do centro germinativo podem ser distinguidas de seus precursores com base na expressão das moléculas de superfície. As células T_{FH} do centro germinativo

apresentam maior expressão de CXCR5 e PD1 em comparação com as células T_{FH} situadas fora desta região (UENO, BANCHEREAU e VINUESA, 2015).

Muitas das funções desempenhadas pelas células T_{FH} estão relacionadas com os marcadores de superfície expressos. O CXCR5, por exemplo, permite a migração das células T_{FH} para a zona de células B dentro dos folículos linfoides. O CD40L presente na superfície das células T_{FH} interagem com CD40 presente nas células B e estimula a diferenciação de células B e a mudança de classe de anticorpos (ARMITAGE et al., 1992). Além disso, as células T_{FH} podem desempenhar sua função de auxiliar as células B por meio da secreção de citocinas. A IL-21 secretada pelas células T_{FH} promove a diferenciação dos linfócitos B e a mudança de classe do anticorpo (OZAKI et al., 2004; PÈNE et al., 2004).

Outras moléculas usadas como marcadores de células T_{FH} não estão diretamente relacionadas à função exercida por essas células, mas sim ao programa de diferenciação celular. A molécula ICOS, por exemplo, contribui para a geração de células T_{FH} em camundongos (BOSSALLER et al., 2006) e humanos (CHOI et al., 2011). A proteína 6 do linfoma de células B - Bcl6 (Sigla do inglês, "B-cell lymphoma 6 protein"), um membro da família de repressores transcricionais que foi primeiramente identificado como um fator de transcrição regulador das células B do centro germinativo (CATTORETTI et al., 1995), é a principal molécula reguladora da diferenciação das células T_{FH} (JOHNSTON et al., 2009).

Recentemente, estudos em camundongos e em humanos têm demonstrado que as células T_{FH} presentes nos órgãos linfoides são compostas por tipos celulares que apresentam características fenotípicas, funcionais e localização distintas (UENO, BANCHEREAU e VINUESA, 2015). A origem das células T_{FH} não se restringe às células T $CD4^+$ "naive" e há algumas evidências que as células T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} e T_{reg} podem adquirir um fenótipo T_{FH} em certas circunstâncias (CROTTY, 2011). Além disso, o controle do número de células T_{FH} parece ser necessário para a manutenção da tolerância aos antígenos próprios. Recentemente, uma população de células T regulatórias ($Foxp3^+$) que expressa CXCR5, PD1, Bcl6 e ICOS foi caracterizada (SAGE et al., 2015; SAGE e SHARPE, 2015). Estas células T folicular regulatória (T_{FR}) suprimem

as células T_{FH} *in vitro* e limitam seu número e o de células B no centro germinativo *in vivo* (LINTERMAN et al., 2012), modulando a diferenciação de plasmócitos, a mudança de classe de anticorpo e a maturação de afinidade (VACCARI e FRANCHINI, 2018). Estudos recentes têm mostrado ainda a existência de células T_{FH} de memória circulantes no sangue periférico em humanos. As células T_{FH} circulantes são um grupo heterogêneo de células que compreendem pelo menos três populações distintas: T_{H1} - like, T_{H2} - like e T_{H17} - like (MA e PHAN, 2017). Estas células diferem das células T_{FH} efetoras e de outras células T de memória, sendo caracterizadas pelo fenótipo $CCR7^+IL-7R\alpha^+CD62L^+CXCR5^+PD-1^{low/-}Bcl6^{low/-}$ (HALE et al., 2013; WEBER, FUHRMANN e HUTLOFF, 2012). A existência de células T_{FH} circulantes pode ser importante para geração de memória em algumas infecções como a pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV (Sigla do inglês, “Human Immunodeficiency Virus”) e a malária.

Evidências obtidas em modelos de malária murina demonstraram que as células T_{FH} são induzidas tanto nas infecções com *P. chabaudi* (PÉREZ-MAZLIAH et al., 2015) quanto *P. yoelii* (ZANDER et al., 2015). Além disso, células T_{FH} funcionais parecem ser necessárias para a produção de anticorpos eficientes durante a infecção com modelo de malária não letal, no qual IL-21 desempenha um papel importante neste processo (PÉREZ-MAZLIAH et al., 2015). Um estudo recente revelou ainda que a infecção com *P. berghei* ANKA prejudica a formação do centro germinativo no baço e compromete a diferenciação de células T_{FH} madura a partir de precursores (RYG-CORNEJO et al., 2016). Embora estes estudos em modelos experimentais sugiram um papel das células T_{FH} no controle do parasito na malária, o mecanismo pelo qual o *Plasmodium* modula a resposta de células T_{FH} e assim a imunidade humoral permanece em aberto (HANSEN et al., 2017).

Em áreas endêmicas de malária, indivíduos com infecções agudas por *P. falciparum* apresentam células T_{FH} circulantes com características fenotípicas e funcionais compatíveis com precursores T_{FH} em camundongos e apresentam baixa capacidade em fornecer ajuda às células B (OBENG-ADJEI et al., 2015). Na malária causada por *P. vivax* também já foi observada a presença de células T_{FH} circulantes que em experimentos *ex vivo* demonstraram ser

eficientes em fornecer ajuda as células B na produção de anticorpos, mas a quantidade de células T_{FH} circulantes parece estar relacionada com o número de infecções prévias (FIGUEIREDO et al., 2017).

1.2.2 Anticorpos na Malária

Evidências obtidas a partir da análise de indivíduos que vivem em áreas endêmicas e modelos experimentais demonstram que a exposição ao plasmódio é capaz de induzir a resposta humoral contra antígenos da fase eritrocítica do parasito, enquanto as formas do ciclo pré-eritrocítico são pouco imunogênicas em condições naturais (HVIID, BARFOD e FOWKES, 2015). Ainda assim, anticorpos monoclonais humanos que reconhecem a proteína circumesporozoíto – CSP (Sigla do inglês, “circumsporozoite protein”) são capazes de conferir proteção estéril contra o *P. falciparum* *in vivo*, provavelmente pela neutralização da motilidade dos esporozoítos na pele e também pela inibição da clivagem da proteína limitando a invasão dos hepatócitos (KISALU et al., 2018). De fato, a vacina em estágio de desenvolvimento mais avançado contra a malária, denominada RTS,S, tem como princípio base a geração de anticorpos contra domínios conservados da CSP de *P. falciparum* (WARDEMANN e MURUGAN, 2018). Porém, como foi mencionado anteriormente a vacina RTS,S induz proteção apenas parcial, evidenciando a capacidade destes parasitos de escapar dos mecanismos efetores da resposta imune (AGNANDJI et al., 2011; WHO, 2016).

Os anticorpos contra os merozoítas livres desempenham um papel importante na imunidade adquirida, prevenindo ou reduzindo a replicação do parasito no sangue e a progressão da doença (MCCALLUM et al., 2016). Estes anticorpos podem exercer vários mecanismos efetores diferentes incluindo: a inibição da invasão dos eritrócitos pelos merozoítos (EGAN et al., 1999), a fagocitose dependente de anticorpo (OSIER et al., 2014) e a ativação do sistema complemento (BOYLE et al., 2015). Os anticorpos IgG1 e IgG3 em humanos e IgG2a em camundongos, que interagem com alta afinidade com receptores de Fc, apresentam maior atividade protetora na malária (CAVINATO et al., 2001; KANA et al., 2017; PERRAUT et al., 2017).

As proteínas de superfície do merozoíto – MSPs (Sigla do inglês, “Merozoite Surface Proteins”) estão envolvidas no processo de invasão dos eritrócitos e anticorpos produzidos naturalmente contra estas proteínas são detectados em indivíduos com malária (HEALER, CHIU e HANSEN, 2018). Anticorpos contra a Proteína de Superfície do Merozoíto 1 (MSP1), notadamente o fragmento C terminal 19 (MSP1₁₉) podem aglutinar os merozoítos impedindo a invasão de novos eritrócitos (GILSON et al., 2008).

Anticorpos funcionais contra os eritrócitos infectados tem como alvo principal proteínas expressas na superfície dos eritrócitos, tais como PfEMP1. Estes anticorpos exibem propriedades funcionais que incluem: inibição da adesão de eritrócitos infectados aos receptores endoteliais, bloqueando o sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação vascular; bloqueio da adesão dos eritrócitos infectados aos receptores da placenta; inibição da formação das rosetas e fagocitose dos eritrócitos parasitados (TEO et al., 2016). A ilustração 3 mostra uma representação dos principais mecanismos efetores dos anticorpos na malária. Os anticorpos também podem neutralizar toxinas do parasito, contribuindo para a redução da patologia (BELACHEW, 2018).

Fonte: adaptado de Teo et al., 2016.

Ilustração 3. Mecanismos efetores dos anticorpos na malária.

Vale ressaltar ainda que vacinas que visam o bloqueio da transmissão da malária se baseiam na geração de anticorpos contra os gametócitos (gametas feminino e masculino) presentes no sangue. Por exemplo, anticorpos anti-fs47, uma proteína expressa na superfície dos gametas femininos, parecem ser capazes de bloquear a fertilização de *P. falciparum* em *Anopheles gambiae* (CANEPA et al., 2018).

1.3 Receptores Purinérgicos e o Sistema Imune

A principal característica de um sistema homeostático é a habilidade de responder rapidamente a qualquer sinal de estresse que pode representar a presença de ameaça de origem endógena ou exógena (DI VIRGILIO e VUERICH, 2015). Partindo desse pressuposto, a teoria do dano trouxe a visão de que o sistema imunológico estaria mais preocupado em responder a sinais de perigo do que o próprio e não próprio, anteriormente estabelecido

(MATZINGER, 2002). Em consonância com essa teoria, o Padrão Molecular Associado ao Dano – DAMP (Sigla do inglês, “Damage Associated Molecular Pattern”) inclui moléculas liberadas de células infectadas ou tecidos injuriados que são reconhecidas pelo sistema imunológico e ativam a resposta inflamatória ou de reparo (ADINOLFI et al., 2018). Várias moléculas podem atuar como DAMP dependendo da circunstância, tais como os nucleotídeos de purina (DI VIRGILIO et al., 2017).

Os receptores purinérgicos reconhecem adenosina trifosfato – ATP (Sigla do inglês, “adenosine triphosphate”) e uracil trifosfato – UTP (Sigla do inglês, “uracil triphosphate”) extracelular e alguns de seus produtos de degradação. Atualmente existem dezenove tipos destes receptores descritos; incluindo quatro receptores do subtipo P1 que reconhecem adenosina, oito receptores do subtipo P2Y que reconhecem ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-glicose e sete receptores do subtipo P2X que reconhecem principalmente ATP (JUNGER, 2011).

Os receptores da família P2X são expressos em várias células do sistema imune tanto em camundongos quanto em humanos, porém com poucas exceções suas funções são desconhecidas (DI VIRGILIO et al., 2017). O receptor P2X1 tem sido implicado na proliferação e na regulação do metabolismo de linfócitos T (LEDDEROSE et al., 2016). O receptor P2X4 parece estar envolvido nas respostas de células T $\gamma\delta$ (WOEHRLE et al., 2010). A função do receptor P2X5 nas células imunes ainda não foi estabelecida, porém aumento da expressão deste receptor em células T humanas ativadas já foi observado (ABRAMOWSKI et al., 2014). O receptor P2X6 não é encontrado em células do sistema imune (DI VIRGILIO, SARTI e GRASSI, 2018). O receptor P2X7 (P2X7R) é o único membro da família P2X que possui um papel relativamente mais bem estabelecido nas repostas imunológicas (DI VIRGILIO et al., 2017). Este receptor era conhecido anteriormente como P2Z e foi primeiramente caracterizado em mastócitos de ratos e chamado de receptor de ATP (COCKCROFT e GOMPERTS, 1980).

O ATP normalmente está presente em baixas concentrações no meio extracelular. Em situações de dano tecidual o ATP é liberado e pode ser reconhecido pelos receptores purinérgicos. O ATP também pode ser liberado

para o meio extracelular durante o processo de ativação celular. Dependendo da concentração, o ATP pode atuar como imunossupressor ou imunoestimulador (DI VIRGILIO e VUERICH, 2015). Em tecidos saudáveis a concentração de ATP no interstício é extremamente baixa, na ordem de nanomolar (nM), porém em sítios inflamados esta concentração pode chegar à ordem de micromolar (μM). A tabela 1 mostra os receptores P2X, seus ligantes e os principais efeitos gerados. Dentre os receptores P2X, o P2X7R é o que necessita de maior quantidade de ATP para ser ativado e o único capaz de levar à formação de poros na membrana celular em resposta ao ATP. Portanto, é provável que em condições fisiológicas a concentração de ATP extracelular não seja suficiente para ativar o P2X7R, mas no curso de uma resposta inflamatória ou em situações em que haja dano tecidual com altas concentrações de ATP extracelular este receptor possa a ser ativado (DI VIRGILIO et al., 2018).

Tabela 1. Principais subtipos de receptores P2X.

RECEPTOR	LIGANTE	AFINIDADE DE LIGAÇÃO (μM)	PRINCIPAL EVENTO
<i>P2X1</i>	ATP	0.05–1	Influxo de Ca^{2+} e Na^+
<i>P2X2</i>	ATP	1–30	Influxo de Ca^{2+}
<i>P2X3</i>	ATP	0.3–1	Influxo de Cátion
<i>P2X4</i>	ATP	1–10	Influxo de Ca^{2+}
<i>P2X5</i>	ATP	1–10	Influxo de íon
<i>P2X6</i>	ATP	1–12	Influxo de íon
<i>P2X7</i>	ATP	>100	Influxo de cátion e formação de poro

Fonte: adaptado de Junger, 2011.

1.3.1 A Importância do P2X7R no Sistema Imune

O P2X7R é uma molécula de membrana trimérica do tipo canal seletivo de íons que, em resposta ao ATP, permite o fluxo de cátions monovalentes (Na^+ , K^+) e bivalentes (Ca^{2+}) (COCKCROFT e GOMPERTS, 1980.). Porém, em altas concentrações de ATP é capaz de formar poros não seletivos na membrana de vários tipos celulares, incluindo as células do sistema imune, que permitem o influxo de moléculas grandes de até 900 Da como o brometo de etídio (HABERMACHER et al., 2015). A formação destes poros parece estar associada à presença de uma longa cauda carboxi-terminal de 293 aminoácidos, que distingue o P2X7R de outros membros da família de receptores P2X (DI VIRGILIO, SARTI e GRASSI, 2018).

No sistema imune inato, o P2X7R está envolvido na quimiotaxia e degranulação de neutrófilos, bem como, na ativação do inflamassoma NLRP3 e consequente maturação e liberação de IL-1 β e IL-18 (CEKIC e LINDEN, 2016). Em macrófagos, o P2X7R desencadeia múltiplos efeitos pró-inflamatórios sendo o mais importante deles a ativação do inflamassoma NLRP3 (DI VIRGILIO, SARTI e GRASSI, 2018). Devido a este papel central no processo inflamatório, o P2X7R tem sido visto com um potencial alvo terapêutico. Estudos usando antagonista de P2X7R ou camundongos nocaute demonstraram que a deleção ou bloqueio desse receptor em modelo experimental reduz a inflamação, por atenuar a ativação do inflamossoma, produção de IL-1 β , IFN- γ , TNF α e IL-17A (WANG et al., 2015; GALAM et al., 2016). Achados recentes mostram também que a ativação do inflamassoma NLRP3 mediada pelo P2X7R inibe a proliferação do *Toxoplasma gondii* em células epiteliais do intestino delgado humano *in vitro* (QUAN et al., 2018). Além disso, vários estudos indicam o papel do P2X7R na proteção contra patógenos intracelulares, tais como: micobactéria, clamídia e *Leishmania*, provavelmente por facilitar a fusão do fagossoma com o lisossoma, a aceleração da acidificação do vacúolo parasitário e a geração de espécies reativas de oxigênio (MOLLOY, LAOCHUMROONVORAPONG e KAPLAN, 1994; COUTINHO-SILVA et al., 2003; CHAVES et al., 2009).

Um número crescente de evidências indicam ainda que o P2X7R está envolvido na ativação, diferenciação e regulação das células T (RISSIEK et al.,

2015). Estudos em modelos experimentais têm demonstrado a importância do P2X7R em vários aspectos da biologia das células T, incluindo: ativação celular, proliferação, produção de citocinas e morte celular. Além disso, vários subtipos de células T apresentam níveis elevados de expressão do P2X7R, tais como: células T regulatórias, células NKT e células T_{FH} (ASWAD, KAWAMURA e DENNERT, 2005; KAWAMURA et al., 2006; PROIETTI et al., 2014). De fato, dentre as subpopulações de células T, as células T_{FH} são as que mais expressam o P2X7R. Além disso, dentre os receptores P2X, as células T_{FH} expressam quase que exclusivamente o P2X7R (PROIETTI et al., 2014). A expressão de P2X7R nas células T_{FH} das placas de Peyer controla a população de células T_{FH} mediante apoptose induzida por ATP, o que favorece a tolerância imunológica à microbiota intestinal (PROIETTI et al., 2014).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância do P2X7R na proteção contra o *P. chabaudi*, observando que camundongos deficientes em P2X7R são mais susceptíveis à malária devido a redução da população de células T_{H1}. Durante o estágio sanguíneo da malária, o P2X7R expresso nas células T CD4⁺ é ativado promovendo a imunidade protetora contra o *P. chabaudi* via expressão do fator de transcrição T-bet e secreção de IFN- γ . A deficiência de P2X7R nas células T CD4⁺ prejudica a diferenciação de células T_{H1}, promovendo a expressão de Bcl6 e consequente diferenciação para o perfil T_{FH} que aumenta a produção de anticorpos anti-plasmódio. No entanto, apesar do aumento nos níveis de anticorpos, a perda de P2X7R associada ao desbalanço T_{H1}/T_{FH} leva a uma maior parasitemia durante a fase crônica da infecção, sugerindo que P2X7R é necessário para o desenvolvimento da reposta imune celular adquirida contra *P. chabaudi* (SALLES, 2016; SALLES et al., 2017). Contudo, pouco se sabe sobre a função deste receptor na regulação das células T_{FH} na malária, que pode estar relacionada à grande susceptibilidade desta população celular à morte celular induzida pelo ATP.

1.3.2 Polimorfismos no Gene *P2RX7* Humano

O gene que codifica o P2X7R (*P2RX7*) é encontrado em pelo menos 55 espécies, mas o número de espécies que têm sido estudadas é bem menor. No homem, o gene *P2RX7* foi primeiramente descrito e está localizado no cromossoma 12q24, sendo composto por 13 éxons (SLUYTER, 2017).

Polimorfismos de nucleotídeo único – SNPs (Sigla do inglês, “single nucleotide polymorphisms”) são mutações genéticas que ocorrem em uma única base do DNA que diferem da base comumente presente na mesma posição do genoma da população. Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras e não codificadoras, sendo que no primeiro caso podem ou não alterar a sequência de aminoácidos da proteína (SEAL et al., 2014). O gene *P2RX7* humano é altamente polimórfico e apresenta 686 SNPs, mas a maioria estão em regiões não codificadoras ou são sinônimos. Existem pelo menos 28 SNPs não sinônimos, dos quais apenas 16 têm efeitos conhecidos descritos sobre a função do P2X7R (SLUYTER e STOKES, 2011).

Mutações no gene *P2RX7* humano podem mudar a expressão da proteína ou sua funcionalidade, interferindo no tráfego intracelular do receptor, na ligação ao ATP, na formação do canal seletivo de íons ou na formação dos poros não seletivo na membrana, gerando fenótipos de perda ou ganho de função (KAMBUR et al., 2018). O mais bem caracterizado SNP de perda de função é o rs3751143 que ocorre na posição 1513 e leva à substituição do ácido glutâmico pela alanina na posição 496 (Glu496Ala). Em estudo *ex vivo*, células de indivíduos com Glu496Ala apresentaram maior resistência à morte celular induzida por altas concentrações extracelulares de ATP (WESSELIUS et al., 2012). Frequentemente, indivíduos que possuem a variante genética rs3751143 apresentam maior susceptibilidade à tuberculose em várias populações diferentes como, por exemplo, caucasianos russos, mestiços mexicanos, australianos e turcos (SLUYTER e STOKES, 2011). Outro SNP de perda de função que altera a sequência da proteína é o rs2230911, no qual ocorre uma mudança de treonina para serina na posição 357 (Thr357Ser), e está relacionado com incapacidade na formação de poros após estímulo com ATP (GONG e CHEN, 2015; TAO et al., 2017). Este SNP também prejudica a indução de morte celular mediada por altas concentrações de ATP em

macrófagos (SLUYTER e STOKES, 2011). Além disso, SNPs no gene que codifica o *P2RX7* têm sido associados à maior susceptibilidade a diversas condições como apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Principais Polimorfismos de Nucleotídeo Único do Gene *P2RX7*.

NÚMERO rs	NUCLEOTÍDEO MUDADO	CONDIÇÕES RELACIONADAS
rs17525809	370T>V	Esclerose Múltipla;
rs28360447	474G>A	Osteoporose;
rs208294	489C>T	Esclerose Múltipla, sepse e dor crônica;
rs7958311	835G>A	Dor crônica;
rs28360457	946G>A	Osteoporose;
rs1718119	1068G>A	Osteoporose, ansiedade e toxoplasmose;
rs2230911	1096C>G	Osteoporose;
rs2230912	1405A>G	Osteoporose, sepse e depressão;
rs3751143	1513A>C	Osteoporose, tuberculose e risco cardiovascular;
rs1653624	1729T>A	Osteoporose.

Fonte: adaptado de Caseley et al., 2014.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✚ Avaliar a importância do P2X7R no controle da população de células T_{FH} e na produção de anticorpos específicos na malária.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar o papel do P2X7R na morte das células T_{FH} do baço de camundongos e na produção de anticorpos específicos ao parasito durante a infecção pelo *P. chabaudi*;
- Analisar o efeito da presença de polimorfismos gênicos com perda de função do P2X7R nos níveis séricos de anticorpos específicos ao parasito em pacientes com malária humana causada por *P. vivax*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, Parasitos, Infecção e Tratamento

Camundongos fêmeas isogênicos C57BL/6, B6.SJL-*Ptprca*^a *Pepcb*^b/BoyJ (CD45.1^{+/+}), B6.129P2-*P2rx7*^{tm1Gab}/J (P2X7R^{-/-}) e B6.129S2-*Cd4*^{tm1Mak}/J (CD4^{-/-}) com idade entre 6-8 semanas foram obtidos do biotério de matrizes de camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas localizado no Departamento de Imunologia e mantidos em condições SPF (Sigla do inglês, “specific pathogen-free”). Os animais foram mantidos em sala com o ciclo claro/escuro invertido por, no mínimo, 15 dias antes da infecção com *P. chabaudi* cepa AS, assegurando que a ruptura dos eritrócitos infectados ocorresse ao redor do meio dia.

Alíquotas de eritrócitos parasitados foram congeladas em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, os parasitos foram mantidos através de sucessivas passagens semanais em camundongos C57BL/6. A cada 12 passagens uma nova alíquota era descongelada. Os animais foram infectados com 10⁶ eritrócitos parasitados injetados via intraperitoneal. A parasitemia foi acompanhada determinando-se a porcentagem de eritrócitos parasitados em lâmina de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa. E no dia do experimento os animais submetidos à eutanásia para retirada do baço.

Em alguns experimentos, os camundongos foram tratados com cloroquina, um antimalárico, visando a eliminação do parasito. Os camundongos foram infectados, como descrito anteriormente, e após o pico de parasitemia, iniciou-se o tratamento. Os animais foram tratados com 10 mg/kg de cloroquina via intraperitoneal durante 7 dias, iniciando no 11 dia pós-infecção até o dia 17 e a parasitemia foi monitorada como descrito acima. No vigésimo dia pós-infecção foram realizados os experimentos.

3.2 Sujeitos Amostrais

A população de estudo é composta por indivíduos adultos de ambos os sexos, excluídas apenas as mulheres em período gestacional. As amostras de sangue foram coletadas de pacientes com malária não complicada atendidos nos estados do Acre, Amapá, Mato Grosso, Pará e Rondônia, após o

diagnóstico positivo para *P. vivax* pelo exame de gota espessa e antes de iniciar o tratamento. No total foram 238 amostras de DNA e 238 amostras de soro, que foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA.

3.3 Análise Fenotípica das Células T_{FH}

Os esplenócitos foram analisados por citometria de fluxo usando os seguintes marcadores de superfície: CD4, CD19, CD138, CD178 (ICOS), IgD, CD95 (Fas), GL7, PD1, CD40L e CXCR5, marcadores intracelulares Bcl6 e Ki67, e marcadores de viabilidade celular *Live and dead* e Anexina V, conjugados à fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), complexo proteína clorofila peridina (PerCP), ficoeritrina-Cy7(PE-Cy7), alofocianina-Cy7 (APC-Cy7), Pacific Blue e AmCyan todos obtidos da BD Pharmingen™.

As células T_{FH} do baço de camundongos infectados e controles foram extraídas por maceração; e os eritrócitos, lisados com solução de saponina. Os leucócitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer, excluindo-se aqueles corados com corante vital (Trypan Blue®). Os esplenócitos (1×10^6) foram então incubados com anticorpos monoclonais (mAbs) específicos para cada antígeno de interesse conjugados a um fluorocromo, diluídos conforme recomendação do fabricante, durante 30 minutos, à 4°C e ao abrigo da luz. Após a marcação, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACS Canto II, BD Bioscience), e os dados foram gerados pelo *software* BD FACSDIVA™ versão 6.2 e analisados pelo FlowJo® versão 9.3.

3.4 Transferência Adotiva de Células CD4⁺

Células do baço de camundongos P2X7R^{-/-} e C57BL/6 não infectados foram obtidas, conforme descrito no item anterior, e a concentração final de células foi ajustada para 2×10^8 /mL suspensa em meio RPMI 1640 (BioWhittaker™). As células foram marcadas com mAb anti-CD19 conjugado à esferas magnéticas (MACS® MicroBeads) e, a seguir, passadas através da coluna Ls MACS®

usando o QuadroMACS™ Separator. Após a passagem pela coluna, a porção negativa foi recuperada e marcada por 30 minutos, ao abrigo da luz, com mAb anti-CD4 conjugados à ficoeritrina-Cy5.5 (PE-Cy5.5) obtidos da Life Technologies™. A seguir, as células T CD4⁺ foram separadas por citometria de fluxo usando o citômetro BD FACSAria™ III. Depois da separação celular, as células viáveis foram contadas novamente; e a concentração, ajustada para 1x 10⁶ suspensas em 500 µL de meio de cultura RPMI 1640 (BioWhittaker™). As células T CD4⁺ do baço de camundongos P2X7R^{-/-} ou C57BL/6 foram então transferidas, por injeção retro-orbital, para camundongos CD4^{-/-}. Três dias após a transferência, os camundongos foram infectados com 1 x 10⁶ eritrócitos parasitados.

3.5 Expressão de Proteínas Heterólogas

O bloco conservado interespecie (ICB) 2-5, da porção N terminal, da Proteína de Superfície do Merozoíto 1 de *P. vivax* (PvMSP1), que codifica um fragmento de 500 aminoácidos e o ICB 10 da porção C terminal de PvMSP1, também chamado de PvMSP1₁₉ (SOARES et al., 1999), que codifica um fragmento de 111 aminoácidos, foram expressos como descrito em detalhes anteriormente (DEL PORTILLO et al., 1992). Resumidamente, as proteínas recombinantes foram expressas em *Escherichia coli* como proteínas fusionadas à glutathione S transferase (GST) e, como controle GST. Os vetores de expressão pGEX-3X-ICB 2-5 e pGEX-3X- PvMSP1₁₉ foram transformados em células competentes *E. coli* cepa BL21 (DE3) e semeados em meio de cultura LB (Luria-Bertani) contendo ampicilina e clorafenicol. Após o crescimento da população de bactérias, a produção das proteínas foram induzidas com D-lactose e incubadas durante à noite à 37 °C sob agitação. Após a expressão durante à noite, as células foram submetidas à centrifugação, onde o pellet foi recuperado para posterior sonicação e sobrenadante descartado. As células foram lisadas através de ultrassons com ciclos de 30 e 15 segundos e amplitude entre 20 a 100, para liberação das proteínas. Após a extração, os lisados bacterianos foram purificados por afinidade em colunas de glutathione - sepharose 4B (Pharmacia). A concentração das proteínas foi determinada pelo

método de Bradford (BRADFORD, 1976) e a análise de pureza foi verificada em gel de eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

3.6 ELISA

Os anticorpos IgM, IgG e subclasses humanos e de camundongos foram detectados por ELISA. Microplacas de 96 poços (Corning®) foram sensibilizadas com extrato de *P. chabaudi* (CAVINATO et al., 2001) ou proteínas recombinantes MSP1 de *P. vivax*, diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6 e incubadas durante à noite à 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão fosfato-salina (PBS) contendo 0,05% de tween 20 (Sigma-Aldrich) e saturadas com PBS contendo 1% albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich), por 3 horas, à temperatura ambiente. Após o bloqueio, foi repetida a etapa de lavagem, em seguida as microplacas foram incubadas com 100 µL de amostras de soro humano ou de camundongo diluídas 1/100 em PBS contendo 0,05% de tween 20 e 1% de BSA, durante à noite e à 4°C. Após as lavagens, como descrito anteriormente, as placas foram incubadas com 50 µL de anticorpos de cabra anti-IgM, IgG e subclasses humanos ou camundongos conjugados à peroxidase, diluídos conforme recomendação do fabricante, por 45 minutos, à temperatura ambiente. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anticorpos de cabra anti-IgM, anti-IgG, anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo conjugados à peroxidase (Southern Biotechnology Associates) e anticorpos de camundongo biotinilados anti-IgM, anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 ou anti-IgG4 de humanos, bem como strepto-avidina peroxidase, todos obtidos da Sigma-Aldrich. Na etapa final, as placas foram lavadas novamente e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich). A reação foi parada com 50 µL de ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada em espectrofotômetro para placas de ELISA (SpectraMax® 190), utilizando o comprimento de onda 450 nm.

3.7 ELISA de Avidéz

A afinidade dos anticorpos IgG e subclasses humanos e de camundongos foi determinada por ELISA de eluição. A presença de anticorpos IgG específicos anti-*P. chabaudi* de alta afinidade foi determinada por ELISA, como descrito no item anterior, acrescentando solução de ureia 6 M por 15 minutos à 37°C, após a etapa de lavagem para retirada das amostras de soro e antes da incubação com anticorpo conjugado com a peroxidase.

3.8 Análise de Polimorfismo de Nucleotídeo Único

As análises dos polimorfismos foram realizadas por Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (sigla do inglês “polymerase chain reaction”), com análise em tempo real (qPCR), usando a tecnologia TaqMan®, descrita anteriormente (WOODWARD, 2014). Em síntese, foram utilizadas placas de qPCR de 96 poços para bloco de 0,1 mL e adicionado em cada poço 4,75 µL de água Milli-Q®, 5,0 µL de TaqMan® Genotyping Master Mix, 0,25 µL de TaqMan® sondas (FAM™ e VIC®) e 1 µL das amostras de DNA na concentração de 20 ng/µL; o volume final de reação foi de 11 µL. A seguir, as placas foram seladas e incubadas por 50 ciclos no aparelho de qPCR QuantStudio® 3 (Applied Biosystems®).

3.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelos testes não paramétricos de análise de variância –ANOVA: *Two-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste do Teste de Bonferroni, quando se tratava de duas variáveis independentes, e *One-way* ANOVA ou Teste de Mann-Whitney no caso de uma única variável independente. As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas no *software* GraphPad Prism na versão 7.0, e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

3.10 Considerações Éticas

Os procedimentos experimentais utilizando camundongos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas estabelecidas para o uso de animais em pesquisa científica. Desse modo, o trabalho foi enviado para apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, e foi aprovado em 07/12/2015 sob o registro 109/2015 com validade de 4 anos.

Os procedimentos experimentais utilizando sangue humano realizados neste trabalho são baseados no uso de material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade do doador e livre de coação conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP). Assim sendo, o protocolo utilizado neste trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH), do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, sendo aprovado sob número de parecer 3.257.187.

4. RESULTADOS

4.1. A ausência de P2X7R leva ao acúmulo precoce de células T_{FH} no baço de camundongos infectados com *P. chabaudi*

Anteriormente, foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que camundongos deficientes em P2X7R, no dia 20 pós-infecção com *P. chabaudi*, apresentam maior parasitemia que camundongos C57BL/6 infectados e acumulam células T_{FH} no baço (SALLES, 2016; SALLES et al., 2017). Para avaliarmos se havia diferença no número de células T_{FH} esplênicas em outros momentos durante a infecção com *P. chabaudi*, nós realizamos a fenotipagem dessas células nos dias 7, 14, 21 e 28 após a infecção, conforme mostrado na figura 1.

Figura continua na próxima página

Figura 1: Cinética das células T_{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} durante a infecção por *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} foram infectados via intraperitoneal com 1x10⁶ eritrócitos parasitados, e, nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 pós-infecção, foi realizada a imunofenotipagem por citometria de fluxo. A) *Contour plots* com *gate* nas células CD4⁺ do baço, mostrando a expressão de PD1 versus CXCR5, Bcl6 e ICOS. As populações positivas foram definidas com base no FMO (sigla do inglês “Fluorescence Minus One”); B) Gráficos da porcentagem de células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺, CD4⁺PD1⁺Bcl6⁺ e CD4⁺PD1⁺ICOS⁺ do baço; C) Gráficos do número absoluto de células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺, CD4⁺PD1⁺Bcl6⁺ e CD4⁺PD1⁺ICOS⁺ do baço. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes, com pelo menos 3 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way* ANOVA, e a barra de erro representa o desvio padrão. Em A, as estrelas vermelhas indicam diferenças estatísticas entre os camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-}. Em B, diferenças significantes foram observadas com **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 entre os camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-}.

Os resultados mostram que a deficiência de P2X7R determinou o aumento das porcentagens e números absolutos de células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺, CD4⁺PD1⁺Bcl6⁺ e CD4⁺PD1⁺ICOS⁺ do baço no dia 14 pós-infecção. Também foi

observada uma população maior de células $CD4^+PD1^+CXCR5^+$ em camundongos $P2X7R^{-/-}$, em relação aos animais C57BL/6, no dia 21 pós-infecção. É interessante notar, ainda, que a população de células T_{FH} aumentou progressivamente até o dia 28 pós-infecção nos camundongos C57BL/6, enquanto o pico dessas células foi antecipado para o dia 14 pós-infecção nos camundongos $P2X7R^{-/-}$. Esses resultados mostram que a falta desse receptor induz o aumento precoce e acentuado da população de células T_{FH} durante a infecção pelo *P. chabaudi*.

Sabendo que camundongos $P2X7R^{-/-}$ apresentam maior quantidade de anticorpos específicos no soro no dia 50 pós-infecção com *P. chabaudi* (SALLES, 2016; SALLES et al., 2017), fomos investigar se o acúmulo de células T_{FH} nos camundongos $P2X7R^{-/-}$ estava presente nesse ponto da infecção.

Figura 2. Células T_{FH} no dia 50 pós infecção com *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 e $P2X7R^{-/-}$ foram infectados via intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos parasitados; e, no dia 50 pós-infecção, foi feita a imunofenotipagem. A) *Contour plots* com *gate* nas células T_{FH} definidos com base no FMO; B) gráfico com a frequência de células $CD4^+PD1^+CXCR5^+$ à direita, e número absoluto à esquerda; C) Gráfico com a

frequência de células CD4⁺PD1⁺ICOS⁺ à direita, e número absoluto à esquerda. Os dados são representativos de um experimento com três animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste T Student e * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, e a barra de erro representa o desvio padrão.

Como esperado, camundongos P2X7R^{-/-} continuam apresentando maior quantidade de células T_{FH} no dia 50 pós-infecção, quando comparados com camundongos C57BL/6 (**Figura 2B**).

4.2 O tratamento com cloroquina reduz o acúmulo de células T_{FH} no baço de camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi*.

Nosso próximo passo foi investigar se a carga parasitária influencia o desenvolvimento da população de células T_{FH} esplênicas durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Essa informação é importante, uma vez que os camundongos P2X7R^{-/-} apresentam deficiência na capacidade de controlar a infecção pelo *P. chabaudi* após o pico da parasitemia (SALLES, 2016; SALLES et al., 2017), podendo causar o acúmulo de células T_{FH}. Portanto, primeiramente nós avaliamos a influência do tratamento com cloroquina no desenvolvimento das células T_{FH} do baço de camundongos C57BL/6 infectados, assim como na morte dessas células através da marcação com Anexina V (**Figura 3**).

Figura 3: Efeitos do tratamento com cloroquina na população de células T_{FH} esplênicas de camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram infectados via intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos parasitados e, após o pico de parasitemia (dia 7), foram tratados com 10 mg/kg de cloroquina durante sete dias, iniciando-se no décimo primeiro dia pós-infecção. A) *Contour plots* mostrando a porcentagem de células T_{FH} nos grupos controle, infectado e tratado; B) Gráfico representativo da porcentagem e número absoluto de células T_{FH} nos grupos controle, infectado e tratado; C) Histograma da expressão de Anexina V dentro da população de células T_{FH} nos grupos controle, infectado e tratado; D) Gráfico representativo do MFI - (sigla do inglês “Mean Fluorescence Intensity”) de Anexina V nos grupos controle, infectado e tratado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com pelo menos quatro animais por grupo. A análise estatística realizada pelo teste *One-way ANOVA* e a barra de erro representam o desvio padrão. Diferenças significantes foram observadas com $**p < 0.01$; ns = não significativo.

Os resultados mostram que o número de células T_{FH} no baço de camundongos C57BL/6 infectados reduziu significativamente após o tratamento com cloroquina, mas ainda é maior que no controle não infectado (**Figuras 3A**

e **3B**). Observamos, ainda, que as células T_{FH} marcam fortemente com anexina V tanto no grupo infectado como no grupo tratado (**Figuras 3C e 3D**). Importa salientar que esses resultados não permitem afirmar com segurança que a carga parasitária está diretamente associada ao acúmulo de células T_{FH} no baço, uma vez que, além de apresentar atividade antimalárica, a cloroquina é imunossupressora (QIN et al., 2014).

4.3 A expressão do P2X7R nas células T $CD4^+$ favorece o acúmulo de células T_{FH} , independentemente da carga parasitária.

Para descartar a influência da parasitemia no acúmulo de células T_{FH} nos camundongos $P2X7R^{-/-}$, nós realizamos a transferência de células $CD4^+$ de camundongos $CD45.1$ e $P2X7R^{-/-}$ ($CD45.2$) para camundongos $CD4^{-/-}$, que foram infectados com o *P. chabaudi*, conforme mostra a figura 4.

Figura 4. Análise das células $CD4^+$ do baço de camundongos $CD45.1$ e $P2X7R^{-/-}$ cotransferidas para camundongos $CD4^{-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*. Células $CD4^+$ de camundongos $CD45.1$ e $P2X7R^{-/-}$ ($CD45.2$) separadas por citometria de fluxo

foram transferidas para camundongos CD4^{-/-}, que foram infectados com 1x10⁶ eritrócitos parasitados três dias após a transferência. Os animais foram avaliados no dia 14 pós-infecção. A) *Contour plot* com *gate* nas células CD4⁺, mostrando a população de células PD1⁺CXCR5⁺ (T_{FH}); B) *Contour plot* com *gate* nas células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺, mostrando as populações de células CD45.1⁺ e CD45.2⁺; C) Frequência de células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺ CD45.1⁺ e CD45.2⁺; D) *Contour plot* com *gate* nas células CD4⁺, mostrando a população de células PD1⁺Bcl6⁺ (T_{FH}); E) *Contour plot* com *gate* nas células CD4⁺PD1⁺Bcl6⁺, mostrando as populações de células CD45.1⁺ e 45.2⁺. Análise estatística realizada pelo teste Mann-Whitney, onde: **p < 0.01, e barra de erro representa o desvio padrão. Os dados referem-se a um experimento com oito animais.

Observamos que, após a transferência de células T CD4⁺ de camundongos 45.1 e P2X7R^{-/-} no mesmo microambiente, a maioria das células T_{FH} foram originadas de células P2X7R^{-/-}. Esses resultados demonstram que a ausência do P2X7R está diretamente implicada no aumento da população de células T_{FH}, descartando a influência do nível elevado de parasitemia como fator determinante para a maior geração dessas células nos camundongos P2X7R^{-/-} infectados pelo *P. chabaudi*.

4.4 A deficiência do P2X7R não influencia a proliferação das células T_{FH} esplênicas durante a infecção com *P. chabaudi*.

Outra possibilidade que poderia explicar o acúmulo de células T_{FH} na ausência do P2X7R seria uma maior capacidade proliferativa. Para testar essa hipótese, nós realizamos um ensaio utilizando Ki67 - um marcador do ciclo celular -, como mostrado na figura 5.

Figura 5. Expressão de Ki67 nas células T_{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} infectados pelo *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} foram infectados via intraperitoneal com 1x10⁶ eritrócitos parasitados, e, no 20 dia pós-infecção, foi feita a retirada do baço. A) *Contour pots* com *gate* nas células CD4⁺, mostrando a população de células PD1⁺CXCR5⁺ (T_{FH}); B) Histograma da expressão de Ki67 à esquerda, e representação gráfica do MFI de Ki67 à direita na população de células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺; C) Gráfico mostrado a porcentagem de células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺; D) Número absoluto de células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com no mínimo quatro animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. *p < 0.05, ns = não significativo, e barra de erro representa o desvio padrão.

A expressão de Ki67 entre as células T_{FH} dos camundongos P2X7R^{-/-} e C57BL/6 infectados não apresentou diferença estatística. Portanto não é possível atribuir o acúmulo de células T_{FH} em camundongos P2X7R^{-/-} à maior capacidade proliferativa em relação à observada nos camundongos C57BL/6.

4.5 O estímulo com ATP *in vitro* induz a exposição de fosfatidilserina nas células T_{FH} esplênicas geradas na infecção com *P. chabaudi* de modo dependente do P2X7R

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório identificaram a presença de células T CD4⁺ esplênicas em apoptose majoritariamente no baço de camundongos C57BL/6 do que em camundongos P2X7R^{-/-} no dia 20 da infecção pelo *P. chabaudi* (SALLES, 2016; SALLES et al., 2017). Os experimentos seguintes foram realizados com o objetivo de compreender melhor como o P2X7R controla a expansão da população de células T_{FH} esplênicas geradas durante a infecção pelo *P. chabaudi*. Primeiramente nós avaliamos a exposição de fosfatidilserina nessas células após estimulação com doses crescentes de ATP, como mostrado na figura abaixo.

Figura 6. Exposição de fosfatidilserina nas células T_{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} infectados com *P. chabaudi*, estimulados ou não com ATP. Camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} foram infectados via intraperitoneal com 1x10⁶ eritrócitos parasitados, e, no 20 dia pós-infecção, foi realizado o experimento. A) *Contour plots* com *gate* nas células CD4⁺, mostrando a população de células PD1⁺CXCR5⁺ (T_{FH}); B) Histograma da expressão de Anexina V nas células PD1⁺CXCR5⁺ após estímulo com doses crescentes de ATP (50-1.000 μM) por 15

minutos a 37°C; D) Gráfico do MFI de Anexina V nas células PD1⁺CXCR5⁺. Os dados referem-se a um experimento com cinco animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way* ANOVA e representado por: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, e a barra de erro representa o desvio padrão.

Os resultados mostram que o ATP extracelular induz a exposição de fosfatidilserina nas células T_{FH} do baço de camundongos C57BL/6, mas não nas células T_{FH} dos animais P2X7R^{-/-} durante a infecção com *P. chabaudi*. A exposição é dose dependente e aumenta conforme a concentração de ATP. Além disso, uma dose muito baixa como 50 µM já é suficiente para induzir o aumento da exposição de fosfatidilserina. Concluimos que as células T_{FH} geradas no baço durante a infecção pelo *P. chabaudi* respondem rapidamente ao ATP extracelular, através da sinalização do P2X7R e externalizam fosfatidilserina.

4.6 As células T_{FH} geradas durante a infecção com *P. chabaudi* são particularmente propensas a morrer de modo dependente do P2X7R.

A exposição de fosfatidilserina é um dos eventos iniciais do processo de morte celular e, em alguns casos, pode ser revertido. Para elucidar se durante a infecção pelo *P. chabaudi* as células T_{FH} são propensas a morrer, nós usamos um ensaio de morte celular utilizando “Live and Dead” (L/D), um corante que se liga à porção anionica de proteínas, sendo empregado como um excelente marcador da integridade da membrana celular, associado à marcação com Anexina V. Nessa análise, comparamos a viabilidade das células T_{FH} e não-T_{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} no dia 20 da infecção pelo *P. chabaudi*, durante o período de 4 horas *ex vivo*, na ausência ou presença de ATP extracelular (**Figura 7**).

Figura 7. Avaliação da morte das células T_{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} infectados, estimulados ou não com ATP. Camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} foram infectados via intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos parasitados, e, no 20 dia pós-infecção, foi realizado o experimento. As células esplênicas foram estimuladas com 300 uM de ATP a 37°C por 1, 2, 3 ou 4 horas ou não estimuladas (tempo zero). A) *Contour plot* mostrando a estratégia de *gate* utilizada; B) Gráfico das porcentagens de células mortas dentre as células CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺ ao longo do tempo; C) Gráfico das porcentagens de células mortas dentre as células CD4⁺PD1⁻CXCR5⁻ ao longo do tempo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com pelo menos 4 camundongos por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way* ANOVA e representada por: **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, e a barra de erro representa o desvio padrão.

Os resultados mostram que a maioria das células T_{FH} morreu espontaneamente no período de 4 horas *ex vivo* de maneira dependente do P2X7R, enquanto outras populações de células T CD4⁺ permanecem viáveis. A morte das células T_{FH} é favorecida na primeira hora após o estímulo com 300 μM de ATP extracelular. No entanto, durante as 4 horas *ex vivo*, não se observou a morte das células não-T_{FH}. Esses resultados mostram que as

células T_{FH} geradas durante a infecção pelo *P. chabaudi* são particularmente propensas à morte mediada pelo P2X7R.

4.7 A estimulação com eritrócitos parasitados aumenta a porcentagem de células T_{FH} *in vitro*.

Segundo Proietti e colaboradores (2014), a ativação de células T_{FH} isoladas das placas de Peyer, através da estimulação com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, regula negativamente a expressão de mRNA para o P2X7R e impede a morte induzida pelo ATP. Esses resultados sugerem que apenas as células T_{FH} que não interagem com as células B dentro do folículo linfóide secundário estão sujeitas a esse mecanismo de morte celular. Baseado nesses achados, nos perguntamos se a ativação das células T_{FH} geradas durante a infecção pelo *P. chabaudi* era capaz de resgatar essas células da morte, mediada pelo P2X7R. Para isso, nós estimulamos as células do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} no dia 20 pós-infecção, com eritrócitos parasitados, e avaliamos a viabilidade das células T CD4⁺ e T_{FH}, como mostrado na figura 8.

Figura 8. Efeitos da estimulação com eritrócitos parasitados na viabilidade das células CD4⁺ e T_{FH} do baço de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} infectados com *P. chabaudi*. Os esplenócitos do dia 20 pós-infecção foram estimulados ou não (RPMI) com eritrócitos parasitados na proporção de 3 eritrócitos para cada esplenócito por 16 horas. A) *Contour plots* com *gate* nas células CD4⁺, mostrando as células mortas (Anexina V⁺ e L/D⁺); B) Gráfico da porcentagem de células mortas entre as células CD4⁺; C) *Contour plots* com *gate* nas células T_{FH} dentre as células vivas (L/D⁻); D) Gráfico da porcentagem de células T_{FH} dentre as células vivas. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way* ANOVA e representada por: **p < 0.01, ***p < 0.001 e a barra de erro representa o desvio padrão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com quatro animais por grupo.

Observamos que a presença de eritrócitos parasitados na cultura celular por 16 horas não causou diferença significativa na frequência de células CD4⁺ mortas, que foi menor na ausência do P2X7R, independentemente do estímulo. No entanto, a porcentagem de células T_{FH} viáveis aumentou após o estímulo com eritrócitos parasitados, quando as células expressavam P2X7R, mas não na sua ausência. Esses resultados sugerem que a ativação das células T_{FH} geradas durante a infecção pelo *P. chabaudi* reduz a sensibilidade à morte celular induzida por ATP e mediada pelo P2X7R.

4.8 A expressão do P2X7R nas células T_{FH} promove a morte *in vivo* destas células durante a infecção com *P. chabaudi*.

Devido ao fato de várias populações celulares expressarem o P2X7R na superfície e tendo em vista a necessidade de evidenciar o papel deste receptor na morte das células T_{FH}, nosso próximo passo foi avaliar a marcação com Anexina V e L/D nessa população, após a transferência de células CD4⁺ de camundongos CD45.1 e P2X7R^{-/-} (CD45.2) em camundongos CD4^{-/-}, conforme mostrado na figura 9.

Figura 9. Análise da morte celular *in vivo* em células T_{FH} geradas durante a infecção pelo *P. chabaudi* que expressam ou não P2X7R. Células $CD4^+$ de camundongos $CD45.1$ e $P2X7R^{-/-}$ ($CD45.2$) separadas por citometria de fluxo foram transferidas para camundongos $CD4^{-/-}$, que foram infectados com 1×10^6 eritrócitos parasitados 3 dias após a transferência. A) *Contour plot* com *gate* nas células $CD4^+$, mostrando a população de células $PD1^+ CXCR5^+$ (T_{FH}); B) *Contour plots* com *gate* nas células T_{FH} $Anexina V^+ L/D^+$ (mortas); C) *Contour plots* com *gates* nas células T_{FH} mortas $CD45.1^+$ e $CD45.1^-$; D) Gráfico da frequência de células T_{FH} mortas $CD45.1^+$ e $CD45.1^-$. Análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, onde: $*p < 0.05$ e barra de erro representa o desvio padrão. Os dados referem-se a 1 experimento com oito animais.

Após a transferência de células $CD4^+$ de camundongos $CD45.1$ e $P2X7R^{-/-}$ em camundongos $CD4^{-/-}$ infectados, observou-se uma porcentagem sete vezes maior de células T_{FH} mortas originadas de camundongos $CD45.1$. Esses resultados indicam a importância do P2X7R expresso nas células T_{FH} na morte destas células *in vivo*.

4.9 Acúmulo de células T_{FH} no baço de camundongos P2X7R^{-/-} está relacionado com maior concentração de anticorpos IgG2a totais e de alta afinidade pelo parasito no soro

Estudos anteriores mostraram que camundongos com deficiência de P2X7R apresentam maiores níveis séricos de anticorpos (PROIETTI et al., 2014; SALLES, 2016; SALLES et al., 2017). Tendo em vista que as células T_{FH} são essenciais para o processo de maturação de afinidade dos anticorpos, avaliamos a seguir a produção de anticorpos específicos totais e de alta afinidade em camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} infectados pelo *P. chabaudi*, conforme apresentado na figura 10.

Figura 10. Produção de IgG2a anti-*P. chabaudi* total e de alta avidéz nos camundongos P2X7R^{-/-} e C57BL/6 durante infecção por *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} foram previamente infectados via intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos parasitados e a coleta de sangue foi feita via Sinus Retro Orbital. Gráficos da quantidade de anticorpos IgG2a totais e IgG2a de alta afinidade específicos antilísado de *P. chabaudi* nos dias 14, 20, 30 e 50 pós-infecção,

respectivamente, medidos por ELISA na ausência ou presença de ureia 6M. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com pelo menos 3 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de *two-way* ANOVA onde: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, e a barra de erro representa o desvio padrão.

Os resultados mostram que os camundongos P2X7R^{-/-} produziam mais anticorpos IgG2a totais e de alta afinidade específicos ao *P. chabaudi* quando comparados com camundongos C57BL/6 no dia 50 pós-infecção (**Figura 10D**). Não foi encontrado nenhuma diferença estatisticamente significativa nos demais dias de infecção (**Figura A-C**).

4.10 A ausência de P2X7R leva ao aumento do número de células B do centro germinativo, mas não afeta a população de plasmócitos no baço de camundongos infectados com *P. chabaudi*.

Nosso próximo passo foi investigar se o acúmulo de células T_{FH} esplênicas nos camundongos P2X7R^{-/-} infectados resultaria em aumento das populações de células B do centro germinativo e plasmócitos, que poderia levar à maior produção de anticorpos IgG totais e de alta afinidade. Portanto, nós fizemos a genotipagem das células B do centro germinativo e plasmócitos no baço dos camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} nos dias 0, 14, 21, 30 e 50 pós-infecção como representado na figura 11.

Figura 11. Células B do centro germitativo e plasmócitos nos camundongos P2X7R^{-/-} e C57BL/6 durante infecção por *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-} foram infectados via intraperitoneal com 1x10⁶ eritrócitos parasitados, e nos

dias 0, 14, 21, 30 e 50 pós-infecção foi realizado a imunofenotipagem. A) *Contour plots* com *gate* nas células CD19⁺ esplênicas, mostrando as populações de células FAS⁺GL7⁺ (células B do centro germinativo) e CD138⁺IgD⁻ (plasmócitos) do baço definidas com base no FMO; B) Gráficos das porcentagens de células B do centro germinativo e plasmócitos; C) Gráficos dos números absolutos de células B do centro germinativo e plasmócitos. Os dados são representativos de 2 experimentos, com pelo menos 3 animais por grupo.

Em nossos resultados não houve diferença na quantidade de plasmócitos esplênicos entre os camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-}. No entanto, no dia 30 p.i., os camundongos P2X7R^{-/-} apresentaram maior número de células B do centro germinativo, quando comparados com camundongos C57BL/6. Esses resultados indicam que a falta do P2X7R também favorece o aumento das células B do centro germinativo.

4.11 Polimorfismos de Nucleotídeo Único que alteram a função de P2X7R estão relacionados com maior quantidade de anticorpos na malária humana

Nosso próximo passo foi avaliar se pacientes com malária que apresentam alteração na função de P2X7R também apresentavam maior quantidades de anticorpos anti-plasmódio. Pacientes com malária causada por *P. vivax* foram investigados para dois conhecidos polimorfismo de nucleotídeo único de P2X7R de perda de função, conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 3. Frequência genotípica e alélica de pacientes com malária pelo *P.vivax* e polimorfismo genético de P2X7R.

SNPs ID	HWE-P	
rs3751143	Frequência Genotípica	
	AA	140 (61,4%)
	AC	82 (36,0%)
	CC	6 (2,6%)
	Total	228 (100%)
	Frequência Alélica	
	A	362 (79,4%)
	C	94 (20,6%)
	Total	456 (100%)
		0.762

			Resultados
rs2230911	Frequência Genotípica		0.326
	CC	160 (70,2%)	
	CG	59 (25,8%)	
	GG	9 (4,0%)	
	Total	228 (100%)	
	Frequência Alélica		
	C	379 (83,1%)	
	G	77 (16,9)	
	Total	456 (100%)	
HWE-P p-value do teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg calculado pelo teste do Qui-quadrado.			

Do total de 228 pacientes analisados, quinze apresentaram algum dos polimorfismos estudados (rs3751143 ou rs2230911). Com intuito de avaliar a quantidade de anticorpos específicos anti-*P. vivax* em indivíduos com perda da função do P2X7R, independente do polimorfismo, nós agrupamos os indivíduos em três, a saber: A/A+C/C (Homozigoto Comum); A/C+C/G (Heterozigoto) e C/C ou G/G (Homozigoto Raro). Então realizamos a dosagem dos anticorpos anti-PvMSP1 por Elisa conforme representado na figura 12 e 13.

Figura 12. Dosagem de anticorpos anti-PvMSP1 ICB2-5 em pacientes com malária causada pelo *P.vivax*. A-E) Absorbância de anticorpos específicos anti-ICB2-5 medidos por Elisa nos pacientes não infectado (controle) e com malária A/A+C/C

(Homozigoto Comum); A/C+C/G (Heterozigoto) e C/C ou G/G (Homozigoto Raro), com um total de 12 pacientes por grupo.

Figura 13. Dosagem de anticorpos anti-PvMSP1₁₉ em pacientes com malária causada pelo *P.vivax*. A-E) Absorbância de anticorpos específicos anti-MSP1₁₉ medidos por Elisa nos pacientes não infectado (controle) e com malária A/A+C/C (Homozigoto Comum); A/C+C/G (Heterozigoto) e C/C ou G/G (Homozigoto Raro), com um total de 12 pacientes por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way* ANOVA e representada por: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, e a barra de erro representa o desvio padrão.

Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada na quantidade de anticorpos contra a porção ICB2-5 da proteína PvMSP1 (**Figura 12**). Mas indivíduos com polimorfismo de perda de função do P2X7R apresentaram maior quantidade de anticorpos IgG3 anti-PvMSP1₁₉ quando comparados com indivíduos P2X7R suficientes (**Figura 13.E**). Esses resultados sugerem que a deficiência de P2X7R em humanos, assim como no modelo experimental, também está relacionada com maior produção de anticorpos.

5. DISCUSSÃO

As células T_{FH} foram descritas pela primeira vez no ano 2000, mas somente nos últimos anos tem sido discutida sua importância na proteção e na patologia de algumas doenças. Além disso, tem crescido o interesse em conhecer a biologia das células T_{FH} devido a seu papel na produção de anticorpos e consequentemente seu interesse para o desenvolvimento de vacinas. Mesmo com os avanços dos últimos anos, ainda existem lacunas sobre a participação das células T_{FH} na malária (PEREZ-MAZLIAH e LANGHORNE, 2015). Assim, neste trabalho, avaliamos o papel do P2X7R no controle da população de células T_{FH} esplênicas e na produção de anticorpos específicos durante a infecção pelo *P. chabaudi* e *P. vivax*.

Estudos recentes mostram o papel essencial desempenhado pelas células T_{FH} para o controle da infecção pelo *Plasmodium*. Camundongos ICOS^{-/-} apresentam redução das células T_{FH} e células B do centro germinativo, assim como na produção de anticorpos parasito-específico de alta afinidade durante a infecção com *P. chabaudi* (WIKENHEISER et al., 2016). Além disso, camundongos com deleção no gene que codifica o fator de transcrição Bcl6 também apresentam disfunção das células T_{FH} do centro germinativo e nas respostas de anticorpos, o que resulta em falha no controle da parasitemia residual crônica em camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi* (PÉREZ-MAZLIAH et al., 2017). Ademais, algumas evidências apoiam um papel crucial das células T_{FH} , também, nas respostas imunológicas na malária humana. Nesse sentido, um estudo recente demonstrou que a infecção com *P. vivax* leva à produção de IL-21 e ao aumento de células T_{FH} circulantes (FIGUEIREDO et al., 2017). Além disso, crianças infectadas com *P. falciparum* que desenvolvem células T_{FH} de memória circulantes são capazes de gerar forte resposta humoral protetora (OBENG-ADJEI et al., 2015).

No dia 20 pós-infecção com *P. chabaudi*, camundongos P2X7R^{-/-} apresentam maior quantidade de células T_{FH} no baço quando comparados com animais C57BL/6, (SALLES, 2016; SALLES et al., 2017). No entanto, este aumento poderia ocorrer apenas neste período da infecção em que se observa maior parasitemia no camundongo P2X7R^{-/-} associada à redução da resposta das células T_{H1} . Ao analisarmos outros períodos da infecção, nós constatamos maior número de células T_{FH} no baço de animais P2X7R^{-/-} precocemente e

mesmo com parasitemia semelhante. Esse achado ressalta a importância do P2X7R no controle da população de células T_{FH} durante a malária. De acordo com estas evidências, outros estudos têm relatado que camundongos P2X7R^{-/-} apresentam maior quantidade de células T_{FH} no centro germinativo das placas de Peyer do intestino delgado (PROIETTI et al., 2014; PERRUZZA et al., 2017). Além disso, foi mostrado recentemente que o ATP liberado por bactérias intestinais limita a geração de IgA contra enteropatógenos (PROIETTI et al., 2019).

O controle preciso do número de células T_{FH} é importante para as reações do centro germinativo. Mutações monogênicas que levam a redução da quantidade de células T_{FH} causam imunodeficiência primária e são associadas a defeitos no centro germinativo, redução da quantidade de células B de memória e dos títulos de anticorpos (PRATAMA e VINUESA, 2013). Por outro lado, aumento da quantidade de células T_{FH} está associada à autoimunidade. Parece que o acúmulo de células T_{FH} pode prejudicar o processo de seleção positiva no centro germinativo, favorecendo o surgimento de células B auto reativas. Em camundongos, o excesso de células T_{FH} está relacionado com produção de auto anticorpos (VINUESA et al., 2005). Além disso, estudos em humanos indicam que indivíduos com doenças autoimunes apresentam maior quantidade de células T_{FH} circulantes (SIMPSON et al., 2010; MA et al., 2012). Sugerindo que o P2X7R é um importante ponto de checagem para o desenvolvimento de doenças autoimunes mediadas por anticorpos, foi mostrado recentemente que a ausência do receptor funcional está associada à produção de auto anticorpos e à maior incidência de lupus eritematoso sintêmico (FALITI et al., 2019).

Na malária, a quantidade de células T_{FH} parece estar inversamente correlacionada com a intensidade da resposta imune gerada na fase aguda da infecção. Na infecção pelo *P. yoelli*, a elevada carga parasitária leva à geração de uma forte resposta imunológica com produção de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias. A alta concentração de TNF- α e IFN- γ prejudica a diferenciação de células T_{FH} do baço de camundongos infectados (RYG-CORNEJO et al., 2016). Em humanos, infecção aguda com *P. falciparum* também induz produção de citocinas do perfil T_{H1} e prejudica a geração de

células T_{FH} circulantes eficazes (OBENG-ADJEI et al., 2015). No entanto, observamos que após a eliminação do parasito com tratamento com cloroquina a quantidade de células T_{FH} foi reduzida. Este resultado possivelmente é devido à atividade imunossupressora da cloroquina e não apenas à influência da carga parasitária, uma vez que o tratamento com cloroquina possui efeitos inibitórios sobre a proliferação e diferenciação das células T (OH et al., 2016).

Quando as células T CD4⁺, que expressavam ou não o P2X7R, foram cotransferidas para o mesmo animal, a maioria das células T_{FH} geradas foram provenientes de células desprovidas do receptor. Esse experimento, descarta a influência da parasitemia no acúmulo de células T_{FH} esplênicas em camundongos P2X7R^{-/-}, uma vez que as células T CD4⁺ deficientes e suficientes compartilhavam o mesmo ambiente. Por outro lado, o acúmulo de células T_{FH} na ausência do P2X7R não pode ser explicado por aumento na capacidade proliferativa dessas células, uma vez que a marcação com Ki67 foi similar entre os grupos de camundongos C57BL/6 e P2X7R^{-/-}. Esse resultado corrobora um estudo prévio, que também não encontrou correlação entre a expressão de Ki67 e acúmulo de células T_{FH} durante o processo de envelhecimento (SAGE et al., 2015).

Altas concentrações de ATP são encontradas após dano tecidual e estão associadas à resposta inflamatória e morte celular. A sinalização via P2X7R pode desencadear morte celular através de mecanismos que envolvem as vias apoptótica ou necrótica, dependendo de fatores como a intensidade do estímulo e o tipo celular envolvido (DRAGANOV et al., 2015). Nas células T de camundongos, a sinalização do ATP extracelular é feita preferencialmente via P2X7R (DI VIRGILIO et al., 2001). No meio extracelular, o ATP extracelular estimula em células T a proliferação celular e a liberação de citocinas (TRAUTMANN, 2009). É bem estabelecido que a apoptose, que um é tipo de morte celular com características morfológicamente distintas, é induzida em células do sistema imune devido a excessiva ou prolongada ativação de P2X7R por exposição ao ATP extracelular (MACKENZIE et al., 2005).

Nós verificamos que, na malária causada pelo *P. chabaudi*, as células T_{FH} esplênicas são altamente sensíveis ao ATP extracelular. Isto é, concentrações muito baixas de ATP são suficientes para induzir a exposição de fosfatidilserina. Observamos ainda que as células T_{FH} do baço de camundongos infectados são susceptíveis à morte celular mediada por ATP. Neste caso, a morte celular desencadeada via P2X7R ocorre pouco tempo após a exposição ao ATP, o que se justifica pela rápida abertura do poro na membrana celular e sugere que vias necróticas possam estar envolvidas. Porém, estímulos com eritrócitos parasitados em cultura celular de esplenócitos aumentam a quantidade de células T_{FH} viáveis *ex vivo*, na presença do receptor P2X7, mas não na ausência. Esses dados sugerem que as células T_{FH} ativadas são mais resistentes ao mecanismo de morte celular mediado pelo receptor P2X7. De acordo com essa ideia, o gene que codifica o receptor P2X7R é negativamente regulado nas células T_{FH} após estimulação via TCR (PROIETTI et al., 2014).

A abundância de células T_{FH} nas placas de Peyer de camundongos deficientes em P2X7R que reconhecem ATP extracelular também está associada à maior resistência à morte celular induzida por ATP (PROIETTI et al., 2014). De forma semelhante aos nossos achados na malária, a estimulação das células T_{FH} nas placas de Peyer através do TCR impede a morte celular induzida pelo ATP dependente do P2X7R. Além disso, recentemente, foi relatado que a morte de células T_{FH} do baço de camundongos inoculados com pristane, um modelo experimental de lupus eritematoso sistêmico, induzida pela estimulação do P2X7R está associada à ativação de caspases e à geração da forma clivada de gasdermina D (FALITI et al., 2019). Estes resultados sugerem que o P2X7R medeia a morte das células T_{FH} por piroptose. Um estudo anterior já havia sugerido que a indução da abertura de poros e a morte de células T possuía características comuns à piroptose (TAYLOR et al., 2008). Este tipo de morte celular é executada pela clivagem da gasdermina D mediada por caspases e liberação da porção responsável pela auto inibição da região N terminal formadora de poro (KAYAGAKI et al., 2015; SHI et al., 2015).

A cooperação entre células T e B é um aspecto fundamental da resposta imune adaptativa e da geração de memória imunológica. As células T_{FH} são especializadas em fornecer ajuda às células B (CROTTY, 2011). Mostramos, ainda, que camundongos P2X7R^{-/-} apresentam expansão da população de células B do centro germinativo do baço. Tal resultado está de acordo com estudos anteriores que também já observaram aumento de células B do centro germinativo em camundongos P2X7R^{-/-} (PROIETTI et al., 2014; SALLES, 2016). Porém nenhum aumento foi observado em relação à população de plasmócitos, que pode ter relação com sítio pesquisado, uma vez que essas células possuem característica circulatória importante e podem se alojar na medula óssea (RIBATTI, 2017).

As células T_{FH} também são essenciais para mudança de classe de anticorpos e no processo de maturação de afinidade (CROTTY, 2014). Anteriormente, já havia sido mostrado pelo nosso grupo de pesquisa que camundongos P2X7R^{-/-} infectados apresentavam maiores níveis séricos de anticorpos anti-*P.chabaudi*, quando comparados com camundongos C57BL/6 infectados (SALLES, 2016). No entanto, camundongos P2X7R^{-/-} apresentavam mais dificuldade no controle da parasitemia que camundongos C57BL/6. Este fato se justificaria se a maior quantidade de anticorpos observadas em camundongos P2X7R^{-/-} fosse de baixa avidéz. Nesse trabalho nós mostramos que camundongos P2X7R^{-/-} produzem maior quantidade de anticorpos anti-*P.chabaudi* de alta afinidade. Esse dado corrobora um estudo anterior que encontrou maior quantidade de anticorpos IgA de alta afinidade contra microrganismos comensais em camundongos P2X7R^{-/-} (PROIETTI et al., 2014). Sendo assim, a maior parasitemia observada em camundongos P2X7R^{-/-} infectados com *P. chabaudi* parece ser devida exclusivamente à deficiência na diferenciação de células T_{H1} produtoras de IFN-γ (SALLES, 2016), que são importantes para a eliminação do parasito na malária (PEREZ-MAZLIAH e LANGHORNE, 2015).

A sinalização via P2X7R também parece regular a morte das células T_{FH} em humanos. As células T_{FH} humanas expressam grande quantidade de P2X7R e aumentam a exposição de fosfatidilserina após estímulo com ATP (PROIETTI et al., 2014). Estudo em indivíduos que apresentam mutação que

leva à perda de função do P2X7R demonstraram que tais indivíduos também apresentam leucócitos com maior resistência à morte celular induzida por ATP extracelular em ensaio *ex vivo* (WESSELIUS et al., 2012).

O gene que codifica o P2X7R humano é altamente polimórfico, e a literatura tem descrito que indivíduos que apresentam polimorfismo neste gene são mais susceptíveis a algumas condições: portadores do polimorfismo rs2230911 possuem maior risco de desenvolver osteoporose (XU et al., 2017); enquanto polimorfismo rs3751143 tem sido associado a elevado risco de desenvolvimento de tuberculose (AREESHI et al., 2016). Este é o primeiro trabalho a relacionar polimorfismos funcionais de perda de função de P2X7R com produção de anticorpos na malária humana. Em nossos resultados, pacientes com polimorfismo de P2X7R apresentaram maiores concentrações de anticorpos IgG3 anti-MSP1₁₉, mas não anti-ICB2-5, durante a infecção com *P. vivax*. Esta diferença pode ser devida à MSP1₁₉ corresponder à porção C terminal da proteína que é mais conservada, enquanto o fragmento ICB2-5 corresponder à região N terminal que é mais polimórfica (SOARES et al., 1997). Além disso, anticorpos anti-MSP1₁₉ são rapidamente adquiridos durante a infecção aguda com *P. vivax* e em torno de 80% dos indivíduos infectados apresentam níveis detectáveis de anticorpos anti-MSP1₁₉ específicos no soro (WANG et al., 2016). Esses anticorpos são negativados em cerca de dois meses após o tratamento e eliminação do parasito (SOARES et al., 1999), e apenas 3% dos indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas são positivos para anticorpos anti-MSP1₁₉ (WANG et al., 2016). Portanto, os anticorpos anti-MSP1₁₉ são bons indicadores de infecções recentes. Embora no nosso trabalho não tenha sido possível avaliar a influência da idade, sexo e do número de episódios de malária na geração de anticorpos anti-MSP1₁₉, a literatura tem reportado que a influência desses fatores é controversa (WANG et al., 2016).

Dando suporte à ideia que polimorfismos de P2X7R estão relacionados com produção exacerbada de anticorpos em humanos, indivíduos com tuberculose que apresentam polimorfismos funcionais de perda de função de P2X7R produzem mais anticorpos IgG anti-micobactéria (WU et al., 2015). Além disso, a observação recente de que as células T_{FH} circulantes de

pacientes com lúpus eritematoso sistêmico são hiporresponsivas ao P2X7R sugere que este receptor possa ser um ponto de checagem importante para impedir a geração de autoanticorpos (FALITI et al., 2019). Nesta perspectiva, torna-se relevante avaliar no futuro se a ausência de P2X7R funcional favorece a produção de autoanticorpos na malária.

Ilustração 4. Representação esquemática da ação do receptor P2X7 na geração de anticorpos de alta afinidade na malária. O ATP liberado em condições de dano tecidual, ativa o P2X7R expresso nas células T_{FH} . As células T_{FH} são sensíveis ao ATP extracelular, e após ativação, ocorre a abertura de poros na membrana, exposição de fosfatidilserina e morte celular. Na ausência da sinalização de P2X7R, este mecanismo de morte celular dependente de P2X7R está inativo, o que resulta no acúmulo de células T_{FH} e maior produção de anticorpos de alta afinidade.

6. CONCLUSÃO

Nossos achados contribuem para a compreensão do papel do P2X7R no controle da população de células T_{FH} esplênica de camundongos e na geração de anticorpos específicos de alta afinidade durante a infecção pelo *P. chabaudi* e *P. vivax*. Nossos resultados mostraram que a expressão do P2X7R é importante para o processo de morte celular das células T_{FH}, contribuindo para o acúmulo destas células na ausência do receptor e que a ausência da sinalização pelo P2X7R contribui para produção de anticorpos específicos de alta afinidade, tanto na malária causada por *P. chabaudi*, quanto por *P. vivax*. Estes resultados vislumbram possíveis aplicações de antagonistas de P2X7R para uso terapêutico ou como adjuvante no desenvolvimento de vacinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOWSKI, P.; OGRODOWCZYK, C.; MARTIN, R.; PONGS. A truncation variant of the cation channel P2RX5 is upregulated during T cell activation.

PLoS One, v.9, n.9, p.1-9, set., 2014.

ADINOLFI, E.; GIULIANI, A.L.; DE MARCHI, E.; PEGORARO, A.; ORIOLI, E.; DI VIRGILIO, F. The P2X7 receptor: a main player in inflammation.

Biochemical Pharmacology, v.151, n.1, p.234-244, mai., 2018.

AGNANDJI, S.T.; LELL, B.; SOULANOUDJINGAR, S.S.; FERNANDES, J.F.; ABOSSOLO, B.P.; CONZELMANN, C.; METHOGO, B.G.; DOUCKA, Y.; FLAMEN, A.; MORDMÜLLER, B.; ISSIFOU, S.; KREMSNER, P.G.; SACARLAL, J.; AIDE, P.; LANASPA, M.; APONTE, J.J.; NHAMUAVE, A.; QUELHAS, D.; BASSAT, Q.; MANDJATE, S.; MACETE, E.; ALONSO, P.; ABDULLA, S.; SALIM, N.; JUMA, O.; SHOMARI, M.; SHUBIS, K.; MACHERA, F.; HAMAD, A.S.; MINJA, R.; MTORO, A.; SYKES, A.; AHMED, S.; URASSA, A.M.; ALI, A.M.; MWANGOKA, G.; TANNER, M.; TINTO, H.; D'ALESSANDRO, U.; SORGHO, H.; VALEA, I.; TAHITA, M.C.; KABORÉ, W.; OUÉDRAOGO, S.; SANDRINE, Y.; GUIGUEMDÉ, R.T.; OUÉDRAOGO, J.B.; HAMEL, M.J.; KARIUKI, S.; ODERO, C.; ONEKO, M.; OTIENO, K.; AWINO, N.; OMOTO, J.; WILLIAMSON, J.; MUTURI-KIOI, V.; LASERSON, K.F.; SLUTSKER, L.; OTIENO, W.; OTIENO, L.; NEKOYE, O.; GONDI, S.; OTIENO, A.; OGUTU, B.; WASUNA, R.; OWIRA, V.; JONES, D.; ONYANGO, A.A.; NJUGUNA, P.; CHILENGI, R.; AKOO, P.; KERUBO, C.; GITAKA, J.; MAINGI, C.; LANG, T.; OLOTU, A.; TSOFA, B.; BEJON, P.; PESHU, N.; MARSH, K.; OWUSU-AGYEI, S.; ASANTE, K.P.; OSEI-KWAKYE, K.; BOAHEN, O.; AYAMBA, S.; KAYAN, K.; OWUSU-OFORI, R.; DOSOO, D.; ASANTE, I.; ADJEI, G.; ADJEI, G.; CHANDRAMOHAN, D.; GREENWOOD, B.; LUSINGU, J.; GESASE, S.; MALABEJA, A.; ABDUL, O.; KILAVO, H.; MAHENDE, C.; LIHELUKA, E.; LEMNGE, M.; THEANDER, T.; DRAKELEY, C.; ANSONG, D.; AGBENYEGA, T.; ADJEI, S.; BOATENG, H.O.; RETTIG, T.; BAWA, J.; SYLVERKEN, J.; SAMBIAN, D.; AGYEKUM, A.; OWUSU, L.; MARTINSON, F.; HOFFMAN, I.; MVALO, T.; KAMTHUNZI, P.; NKOMO, R.; MSIKA, A.; JUMBE, A.; CHOME, N.; NYAKUIPA, D.; CHINTEDZA, J.; BALLOU, W.R.; BRULS, M.; COHEN, J.; GUERRA, Y.; JONGERT, E.; LAPIERRE, D.; LEACH, A.; LIEVENS, M.; OFORI-ANYINAM, O.; VEKEMANS, J.; CARTER, T.; LEBOULLEUX, D.; LOUCQ, C.; RADFORD, A.; SAVARESE, B.; SCHELLENBERG, D.; SILLMAN, M.; VANSADIA, P. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. **The New England Journal of Medicine**, v.365, n.20, p.1863-1875, nov., 2011.

ANSTEY, N.M.; RUSSELL, B.; YEO, T.W.; PRICE, R.N. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v.25, n.5, p.220-227, mai., 2009.

AREESHI, M.Y.; MANDAL, R.K.; DAR, S.; WAHID, M.; KHAN, M.E.; PANDA, A.K.; JAWED, A.; HAQUE, S. P2X7 1513 A>C Polymorphism Confers Increased Risk of Extrapulmonary Tuberculosis: A Meta-analysis of Case-Control Studies. **Current Genomics**, v.17, n.5, p.450-458, abr., 2016.

ARMITAGE, R.J.; FANSLOW, W.C.; STROCKBINE, L.; SATO, T.A.; CLIFFORD, K.N.; MACDUFF, B.M.; ANDERSON, D.M.; GIMPEL, S.D.; DAVIS-SMITH, T.; MALISZEWSKI, C.R. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. **Nature**, v. 357, n.6373, p.80-82, mai., 1992.

ASHLEY, E.A.; PHYO, A.P. Drugs in Development for Malaria. **Drugs**, v.78, n.9, p.861–879, mai., 2018.

ASWAD, F.; KAWAMURA, H.; DENNERT, G. High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. **The Journal of Immunology**, v.175, n.5, p.3075-3083, set., 2005.

AZIZI, M.H.; BAHADORI, M. Brief historical perspectives of malaria in Iran. **Archives of Iranian Medicine**, v.16, n.2, p.131-135, fev., 2013.

BAIRD, J.K. Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.1, p.36-57, jan., 2013.

BELACHEW, E.B. Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. **Journal of Immunology Research**, v.2018, n.1, p.1-6, mar., 2018.

BOSSALLER, L.; BURGER, J.; DRAEGER, R.; GRIMBACHER, B.; KNOTH, R.; PLEBANI, A.; DURANDY, A.; BAUMANN, U.; SCHLESIER, M.; WELCHER, A.A.; PETER, H.H.; WARNATZ, K. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. **The Journal of Immunology**, v.177, n.7, p.4927-4932, out., 2006.

BOYLE, M.J.; REILING, L.; FENG, G.; LANGER, C.; OSIER, F.H.; ASPELING-JONES, H.; CHENG, Y.S.; STUBBS, J.; TETTEH, K.K.; CONWAY, D.J.; MCCARTHY, J.S.; MULLER, I.; MARSH, K.; ANDERS, R.F.; BEESON, J.G. Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v.42, n.3, p.580-590, mar., 2015.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.7, n.72, p.248-254, mai., 1976.

BRAGA, É.M.; FONTES, C.J.F. Malária. In: NEVES, David Pereira et al. **Parasitologia Humana**. 12^a ed. Atheneu, 2011. Cap.17 p.155-176.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia para profissionais de saúde sobre prevenção da malária em viajantes**, 1^a ed. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Resumo Epidemiológico 2018**. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/> >. Acesso em: 18 jan., 2019.

BREITFELD, D.; OHL, L.; KREMMER, E.; ELLWART, J.; SALLUSTO, F.; LIPP, M.; FÖRSTER, R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. **The Journal of Experimental Medicine**, v.192, n.11, p.1545-1552, dez., 2000.

CANEPA, G.E.; MOLINA-CRUZ, A.; YENKOIDIOK-DOUTI, L.; CALVO, E.; WILLIAMS, A.E.; BURKHARDT, M.; PENG, F.; NARUM, D.; BOULANGER, M.J.; VALENZUELA, J.G.; BARILLAS-MURY, C. Antibody targeting of a specific

- region of Pfs47 blocks *Plasmodium falciparum* malaria transmission. **npj Vaccines**, v.3, n.26, p.1-9, jul., 2018.
- CARVALHO, L.H.; SANO, G.; HAFALLA, J.C.; MORROT, A.; CUROTTO, D.E.; LAFAILLE, M.A.; ZAVALA, F. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. **Nature medicine**, v.8, n.2, p.166-170, fev., 2002.
- CASELEY, E.A.; MUENCH, S.P.; ROGER, S.; MAO, H.J.; BALDWIN, S.A.; JIANG, L.H. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.8, p.13344-13371, jul., 2014.
- CATTORETTI, G.; CHANG, C.C.; CECHOVA, K.; ZHANG, J.; YE, B.H.; FALINI, B.; LOUIE, D.C.; OFFIT, K.; CHAGANTI, R.S.; DALLA-FAVERA, R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. **Blood**, v.86, n.1, p.45-53, jul., 1995.
- CAVINATO, R.A.; BASTOS, K.R.; SARDINHA, L.R.; ELIAS, R.M.; ALVAREZ, J.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R. Susceptibility of the different developmental stages of the asexual (schizogonic) erythrocyte cycle of *Plasmodium chabaudi* chabaudi to hyperimmune serum, immunoglobulin (Ig)G1, IgG2a and F(ab')2 fragments. **Parasite Immunology**, v.23, n.11, p.587-597, nov., 2001.
- CEKIC, C.; LINDEN, J. Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.16, n.3, p.177-192, mar., 2016.
- CHAVES, S.P.; TORRES-SANTOS, E.C.; MARQUES, C.; FIGLIUOLO, V.R.; PERSECHINI, P.M.; COUTINHO-SILVA, R.; ROSSI-BERGMANN, B. Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. **Microbes and Infection**, v.11, n.10-11, p.842-849, set., 2009.
- CHAVES, Y.O.; DA COSTA, A.G.; PEREIRA, M.L.; DE LACERDA, M.V.; COELHO-DOS-REIS, J.G.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MALHEIRO, A.; MONTEIRO, W.M.; ORLANDI, P.P.; MARINHO, C.R.; NOGUEIRA, P.A. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malária. **Malaria Journal**, v.15, n.1, p.1-13, ago., 2016.
- CHOI, Y.S.; KAGEYAMA, R.; ETO, D.; ESCOBAR, T.C.; JOHNSTON, R.J.; MONTICELLI, L.; LAO, C.; CROTTY, S. ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. **Immunity**, v.34, n.6, p.932-946, jun., 2011.
- COCKCROFT, S.; GOMPERS, B.D. The ATP4- receptor of rat mast cells. **Biochemical Journal**, v.188, n.3, p.789-798, jun., 1980.
- COUTINHO-SILVA, R1.; STAHL, L.; RAYMOND, M.N.; JUNGAS, T.; VERBEKE, P.; BURNSTOCK, G.; DARVILLE, T.; OJCIUS, D.M. Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. **Immunity**, v.19, n.3, p.403-412, set., 2003.
- COWMAN, A.F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: biology and disease. **Cell**, v.167, n.3, p.610-624, out., 2016.

- CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). **Annual Review of Immunology**, v.29, p.621-663, abr., 2011.
- CROTTY, S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. **Immunity**, v.41, n.4, p.529–542, 16 out., 2014.
- CSÓKA, B.; NÉMETH, Z.H.; TÖRŐ, G.; IDZKO, M.; ZECH, A.; KOSCSÓ, B.; SPOLARICS, Z.; ANTONIOLI, L.; CSERI, K.; ERDÉLYI, K.; PACHER, P.; HASKÓ, G. Extracellular ATP protects against sepsis through macrophage P2X7 purinergic receptors by enhancing intracellular bacterial killing. **The FASEB Journal**, v.29, n.9, p.3626-3637, set., 2015.
- DEL PORTILLO, H.A.; LEVITUS, G.; CAMARGO, L.M.; FERREIRA, M.U.; MERTENS, F. Human IgG responses against the N-terminal region of the Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium vivax*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, Suppl 3, p.77-84, mar., 1992.
- DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, J.M.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLOGNESI, G.; BARICORDI, O.R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, n.3, p.587-600, fev., 2001.
- DI VIRGILIO, F.; DAL BEN, D.; SARTI, A.C.; GIULIANI, A.L.; FALZONI, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**, v.47, n.1, p.15-31, jul., 2017.
- DI VIRGILIO, F.; GIULIANI, A.L.; VULTAGGIO-POMA, V.; FALZONI, S.; SARTI, A.C. Non-nucleotide Agonists Triggering P2X7 Receptor Activation and Pore Formation. **Frontiers in Pharmacology**, v.9, n.39, p.1-10, fev., 2018.
- DI VIRGILIO, F.; SARTI, A.C.; GRASSI, F. Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels. **Current Opinion in Immunology**, v.52, n.1, p.51-59, jun., 2018.
- DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic Signaling in the Immune System. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v.191, n.1, p.117–123, set., 2015.
- DRAGANOV, D.; GOPALAKRISHNA-PILLAI, S.; CHEN, Y.R.; ZUCKERMAN, N.; MOELLER, S.; WANG, C.; ANN, D.; LEE, P.P. Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. **Scientific reports**, v. 5, n.16222, p.1-17, nov., 2015.
- EGAN, A.F.; BURGHHAUS, P.; DRUILHE, P.; HOLDER, A.A.; RILEY, E.M. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth *in vitro*. **Parasite Immunology**, v.21, n.3, p.133-139, mar., 1999.
- EPIPHANIO, S.; CAMPOS, M.G.; PAMPLONA, A.; CARAPAU, D.; PENA, A.C.; ATAÍDE, R.; MONTEIRO, C.A.; FÉLIX, N.; COSTA-SILVA, A.; MARINHO, C.R.; DIAS, S.; MOTA, M.M. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. **PLOS Pathogens**, v.6, n.5, p.1-10, mai., 2010.

FALITI, C.E.; GUALTIEROTTI, R.; ROTTOLI, E.; GEROSA, M.; PERRUZZA, L.; ROMAGNANI, A.; PELLEGRINI, G.; DE PONTE CONTI, B.; ROSSI, R.L.; IDZKO, M.; MAZZA, E.M.C.; BICCIATO, S.; TRAGGIAI, E.; MERONI, P.L.; GRASSI, F. P2X7 receptor restrains pathogenic Tfh cell generation in systemic lupus erythematosus. **The Journal of Experimental Medicine**, v.216, n.2, p.317-336, fev., 2019.

FIGUEIREDO, M.M.; COSTA, P.A.C.; DINIZ, S.Q.; HENRIQUES, P.M.; KANO, F.S.; TADA, M.S.; PEREIRA, D.B.; SOARES, I.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; JANKOVIC, D.; GAZZINELLI, R.T.; ANTONELLI, L.R.D.V. T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. **PLOS Pathogens**, v.13, n.7, p.1-23, jul., 2017.

FRIED, M.; DUFFY, P.E. Malaria during Pregnancy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.7, n.6, p.1-25, jun., 2017.

GALAM, L.; RAJAN, A.; FAILLA, A.; SOUNDARARAJAN, R.; LOCKEY, R.F.; KOLLIPUTI, N. Deletion of P2X7 attenuates hyperoxia-induced acute lung injury via inflammasome suppression. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.310, n.6, p.L572-L581, mar., 2016.

GILSON, P.R.; O'DONNELL, R.A.; NEBL, T.; SANDERS, P.R.; WICKHAM, M.E.; MCELWAIN, T.F.; KONING-WARD, T.F.; CRABB, B.S. MSP1(19) miniproteins can serve as targets for invasion inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* provided they contain the correct domains for cell surface trafficking. **Molecular Microbiology**, v.68, n.1, p.124-138, abr., 2008.

GONG, QIONG-YAO; CHEN, YONG. Correlation between P2X7 receptor gene polymorphisms and gout. **Rheumatology international**, v.35, n.8, p.1307-1310, ago., 2015.

HABERMACHER, C.; DUNNING, K.; CHATAIGNEAU, T.; GRUTTER, T. Molecular structure and function of P2X receptors. **Neuropharmacology**, v.29, n.15, p.1-8, jul., 2015.

HALE, J.S.; YOUNGBLOOD, B.; LATNER, D.R.; MOHAMMED, A.U.; YE, L.; AKONDY, R.S.; WU, T.; IYER, S.S.; AHMED, R. Distinct memory CD4+ T cells with commitment to T follicular helper- and T helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. **Immunity**, v.38, n.4, p.805-817, abr., 2013.

HANSEN, D.S.; OBENG-ADJEI, N.; LY, A.; IOANNIDIS, L.J.; CROMPTON, P.D. Emerging concepts in T follicular helper cell responses to malaria. **International Journal for Parasitology**, v.47, n.2-3, p.105-110, fev., 2017.

HEALER, J.; CHIU, C.Y.; HANSEN, D.S. Mechanisms of naturally acquired immunity to *P. falciparum* and approaches to identify merozoite antigen targets. **Parasitology**, v.145, n.7, p.839-847, jun., 2018.

HVIID, L.; BARFOD, L.; FOWKES, F. J. I. Trying to Remember: Immunological B Cell Memory to Malaria. **Trends in Parasitology**, v.31, n.3, p.89-94, mar., 2015.

JOHNSTON, R.J.; POHOLEK, A.C.; DITORO, D.; YUSUF, I.; ETO, D.; BARNETT, B.; DENT, A.L.; CRAFT, J.; CROTTY, S. Bcl6 and Blimp-1 Are

- Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. **Science**, v.325, n.5943, p.1006-1010, ago., 2009.
- JUNGER, W. G. Immune Cell Regulation by Autocrine Purinergic Signalling. **Nature Reviews. Immunology**, v.11, n.3, p.201–212, mar., 2011.
- KAMBUR, O.; KAUNISTO, M.A.; WINSVOLD, B.S.; WILSGAARD, T.; STUBHAUG, A.; ZWART, J.A.; KALSO, E.; NIELSEN, C.S. Genetic variation in P2RX7 and pain tolerance. **Pain**, v.159, n.6, p.1064-1073, jun., 2018.
- KANA, I.H.; ADU, B.; TIENDREBEOGO, R.W.; SINGH, S.K.; DODOO, D.; THEISEN, M. Naturally Acquired Antibodies Target the Glutamate-Rich Protein on Intact Merozoites and Predict Protection Against Febrile Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v.215, n.4, p.623-630, fev., 2017.
- KAWAMURA, H.; ASWAD, F.; MINAGAWA, M.; GOVINDARAJAN, S.; DENNERT, G. P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis. **The Journal of Immunology**, v.176, n.4, p.2152-2160, fev., 2006.
- KAYAGAKI, N.; STOWE, I.B.; LEE, B.L.; O'ROURKE, K.; ANDERSON, K.; WARMING, S.; CUELLAR, T.; HALEY, B.; ROOSE-GIRMA, M.; PHUNG, Q.T.; LIU, P.S.; LILL, J.R.; LI, H. WU, J.; KUMMERFELD, S.; ZHANG, J.; LEE, W.P.; SNIPAS, S.J.; SALVESEN, G.S.; MORRIS, L.X.; FITZGERALD, L.; ZHANG, Y.; BERTRAM, E.M.; GOODNOW, C.C.; DIXIT, V.M. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v.526, n.7575, p.666-671, out., 2015.
- KISALU, N.K.; IDRIS, A.H.; WEIDLE, C.; FLORES-GARCIA, Y.; FLYNN, B.J.; SACK, B.K.; MURPHY, S.; SCHÖN, A.; FREIRE, E.; FRANCICA, J.R.; MILLER, A.B.; GREGORY, J.; MARCH, S.; LIAO, H.X.; HAYNES, B.F.; WIEHE, K.; TRAMA, A.M.; SAUNDERS, K.O.; GLADDEN, M.A.; MONROE, A.; BONSIGNORI, M.; KANEKIYO, M.; WHEATLEY, A.K.; MCDERMOTT, A.B.; FARNEY, S.K.; CHUANG, G.Y.; ZHANG, B.; CHAKRAVARTY, S.; KWONG, P.D.; SINNIS, P.; BHATIA, S.N.; KAPPE, S.H.; SIM, K.L.; HOFFMAN, S.L.; ZAVALA, F.; PANCERA, M.; SEDER, R.A. A human monoclonal antibody prevents malaria infection by targeting a new site of vulnerability on the parasite. **Nature Medicine**, v.24, n.4, p.408-416, mai., 2018.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, ago., 1970.
- LAMB, T.J.; BROWN, D.E.; POTOCHNIK, A.J.; LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.8, n. 6, p.1-22, mar., 2006.
- LANGHORNE, J.; GILLARD, S.; SIMON, B.; SLADE, S.; EICHMANN, K. Frequencies of CD4+ T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. **International Immunology**, v.1, n.4, p.416-424, out., 1989.
- LEDDEROSE, C.; BAO, Y.; LEDDEROSE, S.; WOHRLE, T.; HEINISCH, M.; YIP, L.; ZHANG, J.; ROBSON, S.C.; SHAPIRO, N.I.; JUNGER, W.G. Mitochondrial Dysfunction, Depleted Purinergic Signaling, and Defective T Cell

Vigilance and Immune Defense. **The Journal of Infectious Diseases**, v.213, n.3, p.456-464, fev., 2016.

LEE, A.H.; SYMINGTON, L.S.; FIDOCK, D.A. DNA repair mechanisms and their biological roles in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.78, n.3, p.469-486, set., 2014.

LI, C.; SEIXAS, E.; LANGHORNE, J. Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. **Medical Microbiology and Immunology**, v.3, n.189, p.115-126, abr., 2001.

LINTERMAN, M. A.; PIERSON, W.; LEE, S.K.; KALLIES, A.; KAWAMOTO, S.; RAYNER, T.F.; SRIVASTAVA, M.; DIVEKAR, D.P.; BEATON, L.; HOGAN, J.J.; FAGARASAN, S.; LISTON, A.; SMITH, K.G.; VINUESA, C.G. Foxp3 (+) follicular regulatory T cells control T follicular helper cells and the germinal centre response. **Nature Medicine**, v.17, n.8, p.975–982, jan., 2012.

LOCCI, M.; HAVENAR-DAUGHTON, C.; LANDAIS, E.; WU, J.; KROENKE, M.A.; ARLEHAMN, C.L.; SU, L.F.; CUBAS, R.; DAVIS, M.M.; SETTE, A.; HADDAD, E.K; INTERNATIONAL AIDS VACCINE INITIATIVE PROTOCOL C PRINCIPAL INVESTIGATORS.; POIGNARD, P.; CROTTY, S. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. **Immunity**, v.39, n.4, p.758-759, out., 2013.

MA, C.S.; DEENICK, E.K.; BATTEN, M.; TANGYE, S.G. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.209, n.7, p.1241-1253, jul., 2012.

MA, C.S.; PHAN, T.G. Here, there and everywhere: T follicular helper cells on the move. **Immunology**, v.152, n.3, p.382-387, nov., 2017.

MACKENZIE, A.B.; YOUNG, M.T.; ADINOLFI, E.; SURPRENANT, A. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.40, p.33968-33976, out., 2005.

MALES, S.; GAYE, O.; GARCIA, A. Long-Term Asymptomatic Carriage of *Plasmodium Falciparum* Protects from Malaria Attacks: A Prospective Study among Senegalese Children. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v.46, n.4, p.516–522, fev., 2008.

MANZ, R. A.; THIEL, A.; RADBRUCH, A. Lifetime of Plasma Cells in the Bone Marrow. **Nature**, v.388, n.6638, p.133–134, jul., 1997.

MARINHO, C.R.; NERES, R.; EPIPHANIO, S.; GONÇALVES, L.A.; CATARINO, M.B.; PENHA-GONÇALVES, C. Recrudescence *Plasmodium berghei* from pregnant mice displays enhanced binding to the placenta and induces protection in multigravida. **PLoS One**, v.4, n.5, p.1-10, mai., 2009.

MARKUS, M.B. Do hypnozoites cause relapse in malaria? **Trends in Parasitology**, v.31, n.6, p.239-245, jun., 2015.

- MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v.28, n.1-2, p.51-60, jan-fev., 2006.
- MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v.296, n.5566, p.301-305, abr., 2002.
- MOLLOY A.; LAOCHUMROONVORAPONG, P.; KAPLAN, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guérin. **The Journal of Experimental Medicine**, v.80, n.4, p.1499-1509, out., 1994.
- MCCALLUM, F.J.; PERSSON, K.E.; FOWKES, F.J.; REILING, L.; MUGYENYI, C.K.; RICHARDS, J.S.; SIMPSON, J.A.; WILLIAMS, T.N.; GILSON, P.R.; HODDER, A.N.; SANDERS, P.R.; ANDERS, R.F.; NARUM, D.L.; CHITNIS, C.; CRABB, B.S.; MARSH, K.; BEESON, J.G. Differing rates of antibody acquisition to merozoite antigens in malaria: implications for immunity and surveillance. **Journal of Leukocyte Biology**, v.4, n.101, p.913-925, nov., 2016.
- NAING, C.; WHITTAKER, M.A.; NYUNT WAI, V.; MAK, J.W. Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: A Systematic review and meta-analysis, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.8, p.1-11, ago., 2014.
- OBENG-ADJEI, N.; PORTUGAL, S.; TRAN, T.M.; YAZEY, T.B.; SKINNER, J.; LI, S.; JAIN, A.; FELGNER, P.L.; DOUMBO, O.K.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; TRAORE, B.; CROMPTON, P.D. Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. **Cell Reports**, v.13, n.2, p.425-439, out., 2015.
- OH, S.; SHIN, J.H.; JANG, E.J.; WON, H.Y.; KIM, H.K.; JEONG, M.G.; KIM, K.; HWANG, E.S. Anti-inflammatory activity of chloroquine and amodiaquine through p21-mediated suppression of T cell proliferation and Th1 cell differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.474, n.2, p.345-350, mai., 2016.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v.9, n.115, p.115-130, abr., 2010.
- OSIER, F.H.; FENG, G.; BOYLE, M.J.; LANGER, C.; ZHOU, J.; RICHARDS, J.S.; MCCALLUM, F.J.; REILING, L.; JAWOROWSKI, A.; ANDERS, R.F.; MARSH, K.; BEESON, J.G. Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. **BMC Medicine**, v.12, n.108, p.108-123, jul., 2014.
- OZAKI, K.; SPOLSKI, R.; ETTINGER, R.; KIM, H.P.; WANG, G.; QI, C.F.; HWU, P.; SHAFFER, D.J.; AKILESH, S.; ROOPENIAN, D.C.; MORSE, H.C.R.D.; LIPSKY, P.E.; LEONARD, W.J. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. **The Journal of Immunology**, v.173, n.9, p.5361-5371, nov., 2004.
- PÈNE, J.; GAUCHAT, J.F.; LÉCART, S.; DROUET, E.; GUGLIELMI, P.; BOULAY, V.; DELWAIL, A.; FOSTER, D.; LECRON, J.C.; YSSEL, H. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. **The Journal of Immunology**, v.172, n.9, p.5154-5157, mai., 2004.

- PEREZ-MAZLIAH, D.; LANGHORNE, J. CD4 T-Cell Subsets in Malaria: TH1/TH2 Revisited. **Frontiers in Immunology**, v.5, n.671, p.671-678, jan., 2015.
- PÉREZ-MAZLIAH, D.; NG, D.H.; FREITAS DO ROSÁRIO, A.P.; MCLAUGHLIN, S.; MASTELIC-GAVILLET, B.; SODENKAMP, J.; KUSHINGA, G.; LANGHORNE, J. Disruption of IL-21 signaling affects T cell-B cell interactions and abrogates protective humoral immunity to malaria. **PLOS Pathogens**, v.11, n.3, p.1-24, mar., 2015.
- PÉREZ-MAZLIAH, D.; NGUYEN, M.P.; HOSKING, C.; MCLAUGHLIN, S.; LEWIS, M.D.; TUMWINE, I.; LEVY, P.; LANGHORNE, J. Follicular Helper T Cells are Essential for the Elimination of Plasmodium Infection. **EBioMedicine**, v.24, n.1, p.216-230, out., 2017.
- PERRAUT, R.; VARELA, M.L.; JOOS, C.; DIOUF, B.; SOKHNA, C.; MBENGUE, B.; TALL, A.; LOUCOUBAR, C.; TOURÉ, A.; MERCEREAU-PUIJALON, O. Association of antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-4 with protection against clinical malaria. **Vaccine**, v.35, n.48, p.6720-6726, dez., 2017.
- PERRUZZA, L.; GARGARI, G.; PROIETTI, M.; FOSSO, B.; D'ERCHIA, A.M.; FALITI, C.E.; REZZONICO-JOST, T.; SCRIBANO, D.; MAURI, L.; COLOMBO, D.; PELLEGRINI, G.; MOREGOLA, A.; MOOSER, C.; PESOLE, G.; NICOLETTI, M.; NORATA, G.D.; GEUKING, M.B.; MCCOY, K.D.; GUGLIELMETTI, S.; GRASSI, F. T Follicular Helper Cells Promote a Beneficial Gut Ecosystem for Host Metabolic Homeostasis by Sensing Microbiota-Derived Extracellular ATP. **Cell Reports**, v.18, n.11, p.2566-2575, mar., 2017.
- PRATAMA, A.; VINUESA, C.G. Control of TFH cell numbers: why and how?. **Immunology and cell biology**, v.92, n.1, p.40-48, jan., 2014.
- PROIETTI, M.; CORNACCHIONE, V.; REZZONICO JOST, T.; ROMAGNANI, A.; FALITI, C. E.; PERRUZZA, L.; RIGONI, R.; RADAELLI, E.; CAPRIOLI, F.; PREZIUSO, S.; BRANNETTI, B.; THELEN, M.; MCCOY, K. D.; SLACK, E.; TRAGGIAI, E.; GRASSI, F. ATP-Gated Ionotropic P2X7 Receptor Controls Follicular T Helper Cell Numbers in Peyer's Patches to Promote Host-Microbiota Mutualism. **Immunity**, v.41, n.5, p.789–801, nov., 2014.
- PROIETTI, M.; PERRUZZA, L.; SCRIBANO, D.; PELLEGRINI, G.; D'ANTUONO, R.; STRATI, F.; RAFFAELLI, M.; GONZALEZ, S.F.; THELEN, M.; HARDT, W.D.; SLACK, E.; NICOLETTI, M.; GRASSI, F. ATP released by intestinal bacteria limits the generation of protective IgA against enteropathogens. **Nature Communications**, v.10, n.1, p.250-261, jan., 2019.
- QI, H.; CHEN, X.; CHU, C.; LIU, D.; MA, W.; WANG, Y.; WU, L.; YAN, H.; YAN, J. Tfh cell differentiation and their function in promoting B-cell responses. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.4, n.841, p.153-180, set., 2014.
- QIN, X.; CHEN, G.; FENG, Y.; ZHU, X.; DU, Y.; PANG, W.; QI, Z.; CAO, Y. Early Treatment with Chloroquine Inhibits the Immune Response against *Plasmodium yoelii* Infection in Mice. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.234, n.4, p.271-80, dez., 2014.

- QUAN, J.H.; HUANG, R.; WANG, Z.; HUANG, S.; CHOI, I.W.; ZHOU, Y.; LEE, Y.H.; CHU, J.Q. P2X7 receptor mediates NLRP3-dependent IL-1 β secretion and parasite proliferation in *Toxoplasma gondii*-infected human small intestinal epithelial cells. **Parasites & Vectors**, v.11, n.1, p.1-10, jan., 2018.
- RIBATTI, D. The discovery of plasma cells: An historical note. **Immunology Letters**, v.188, n.1, p.64-67, ago., 2017.
- RISSIEK, B.; HAAG, F.; BOYER, O.; KOCH-NOLTE, F.; ADRIOUCH, S. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. **Frontiers in Immunology**, v.6, n.19, p.204, mai., 2015.
- RYG-CORNEJO, V.; IOANNIDIS, L.J.; LY, A.; CHIU, C.Y.; TELLIER, J.; HILL, D.L.; PRESTON, S.P.; PELLEGRINI, M.; YU, D.; NUTT, S.L.; KALLIES, A.; HANSEN, D.S. Severe malaria infections impair germinal center responses by inhibiting T follicular helper cell differentiation. **Cell Reports**, v.14, n.1, p.68-81, jan., 2016.
- SAGE, P.T.; TAN, C.L.; FREEMAN, G.J.; HAIGIS, M.; SHARPE, A.H. Defective TFH cell function and increased TFR cells contribute to defective antibody production in aging. **Cell reports**, v.12, n.2, p.163-171, jul., 2015.
- SAGE, PETER T.; SHARPE, ARLENE H. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. **Trends in immunology**, v.36, n.7, p.410-418, jul., 2015.
- SALLES, É.M. Efeitos da sinalização purinérgica durante a infecção aguda e crônica pelo *Plasmodium chabaudi* AS. 2016. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.
- SALLES, É.M.; MENEZES, M.N.; SIQUEIRA, R.; BORGES DA SILVA, H.; AMARAL, E.P.; CASTILLO-MÉNDEZ, S.I.; CUNHA, I.; CASSADO, A.D.A.; VIEIRA, F.S.; OLIVIERI, D.N.; TADOKORO, C.E.; ALVAREZ, J.M.; COUTINHO-SILVA, R.; D'IMPÉRIO-LIMA, M.R. P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. **PLOS Pathogens**, v.13, n.8, p.1-29, ago., 2017.
- SCHAERLI, P.; WILLIMANN, K.; LANG, A.B.; LIPP, M.; LOETSCHER, P.; MOSER, B. CXC Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function. **The Journal of Experimental Medicine**, v.192, n.11, p.1553-1562, dez., 2000.
- SEAL, A.; GUPTA, A.; MAHALAXMI, M.; AYKKAL, R.; SINGH, T.R.; ARUNACHALAM V. Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. **International Journal of Bioinformatics Research and Applications**, v.10, n.3, p.264-296, out., 2014.
- SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, K.; SHI, X.; WANG, Y.; HUANG, H.; ZHUANG, Y.; CAI, T.; WANG, F.; SHAO, F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v.526, n.7575, p.660-665, out., 2015.
- SIMPSON, N.; GATENBY, P.A.; WILSON, A.; MALIK, S.; FULCHER, D.A.; TANGYE, S.G.; MANKU, H.; VYSE, T.J.; RONCADOR, G.; HUTTLEY, G.A.;

- GOODNOW, C.C.; VINUESA, C.G.; COOK, M.C. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v.62, n.1, p.234-244, jan., 2010.
- SINGLA, N.; GUPTA, D.; JOSHI, A.; BATRA, N.; SINGH, J. Genetic polymorphisms in the P2X7 gene and its association with susceptibility to tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.16, n.2, p.224-229, fev., 2012.
- SLUYTER, R. The P2X7 Receptor. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.1051, n.1, p.17-53, jun., 2017.
- SLUYTER, R.; STOKES, L. Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences**, v.5, n.1, p.41-54, abr., 2011.
- SMITH, K. G.; HEWITSON, T. D.; NOSSAL, G. J.; TARLINTON, D. M. The Phenotype and Fate of the Antibody-Forming Cells of the Splenic Foci. **European Journal of Immunology**, v.26, n.2, p.444-448, fev., 1996.
- SOARES, I.S.; DA CUNHA, M.G.; SILVA, M.N.; SOUZA, J.M.; DEL PORTILLO, H.A.; RODRIGUES, M.M. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, n.3, p.357-363, mar., 1999.
- SOARES, I.S.; LEVITUS, G.; SOUZA, J.M.; DEL PORTILLO, H.A.; RODRIGUES, M.M. Acquired Immune Responses to the N- and C-Terminal Regions of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in Individuals Exposed to Malaria. **Infection and Immunity**, v.65, n.5, p.1606-1614, mai., 1997.
- SOON, M.S.F.; HAQUE, A. Recent Insights into CD4+ Th Cell Differentiation in Malaria. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 6, p.1965-1975, mar., 2018.
- STEPHENS, R.; CULLETON, R. L.; LAMB, T. J. The Contribution of Plasmodium Chabaudi to Our Understanding of Malaria. **Trends in Parasitology**, v.28, n.2, p.73-82, fev., 2012.
- TAO, J.H.; CHENG, M.; TANG, J.P.; DAI, X.J.; ZHANG, Y.; LI, X.P.; LIU, Q.; WANG, Y.L. Single nucleotide polymorphisms associated with P2X7R function regulate the onset of gouty arthritis. **PLoS One**, v.12, n.8, p.1-13, ago., 2017.
- TAYLOR, S.R.; GONZALEZ-BEGNE, M.; DEWHURST, S.; CHIMINI, G.; HIGGINS, C.F. MELVIN, J.E.; ELLIOTT, J.I. Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death. **The Journal of Immunology**, v.180, n.1, p.300-308, jan., 2008.
- TAYLOR, W.R.J.; HANSON, J.; TURNER, G.D.H.; WHITE, N.J.; DONDORP, A.M. Respiratory manifestations of malaria. **Chest**, v.142, n.2, p.492-505, ago., 2012.

- TEO, A.; FENG, G.; BROWN, G.V.; BEESON, J.G.; ROGERSON, S.J. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. **Trends in Parasitology**, v.32, n.11, p.887-898, nov., 2016.
- TRAUTMANN, A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". **Science Signaling**, v.2, n.56, p.1-6, fev., 2009.
- TROYE-BLOMBERG, M.; RILEY, E.M.; KABILAN, L.; HOLMBERG, M.; PERLMANN, H.; ANDERSSON, U.; HEUSSER, C.H.; PERLMANN, P. Production by activated human T cells of interleukin 4 but not interferon-gamma is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.14, p.5484-5488, jul., 1990.
- UENO, H.; BANCHEREAU, J.; VINUESA, C.G. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. **Nature Immunology**, v.16, n.2, p.142-52, fev., 2015.
- VACCARI, M.; FRANCHINI, G. T Cell Subsets in the Germinal Center: Lessons from the Macaque Model. **Frontiers in Immunology**, v.9, n.348, p.1-11, fev., 2018.
- VAN ESSEN, D.; KIKUTANI, H.; GRAY, D. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. **Nature**, v.378, n.6557, p.620-3, dez., 1995.
- VINUESA, C.G.; COOK, M.C.; ANGELUCCI, C.; ATHANASOPOULOS, V.; RUI, L.; HILL, K.M.; YU, D.; DOMASCHENZ, H.; WHITTLE, B.; LAMBE, T.; ROBERTS, I.S.; COPLEY, R.R.; BELL, J.I.; CORNALL, R.J.; GOODNOW, C.C. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. **Nature**, v.435, n.7041, p.452-458, mai., 2005.
- WALLIKER, D.; CARTER, R.; MORGAN, S. Genetic recombination in malaria parasites. **Nature**, v.232, n.5312, p.561-2, ago., 1971.
- WANG, Q.; ZHAO, Z.; ZHANG, X.; LI, X.; ZHU, M.; LI, P.; YANG, Z.; WANG, Y.; YAN, G.; SHANG, H.; CAO, Y.; FAN, Q.; CUI, L. Naturally Acquired Antibody Responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia. **PLoS One**, v.11, n.3, p. 1-20, mar., 2016.
- WANG, S.; ZHAO, J.; WANG, H.; LIANG, Y.; YANG, N.; HUANG, Y. Blockage of P2X7 attenuates acute lung injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome. **International immunopharmacology**, v.27, n.1, p.38-45, jul., 2015.
- WARDEMANN, H.; MURUGAN, R. From human antibody structure and function towards the design of a novel *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein malaria vaccine. **Current Opinion in Immunology**, v.53, n.1, p.119-123, ago., 2018.
- WEBER, J.P.; FUHRMANN, F.; HUTLOFF, A. T-follicular helper cells survive as long-term memory cells. **European Journal of Immunology**, v.42, n.8, p.1981-1988, ago., 2012.

- WESSELIUS, A.; BOURS, M.J.; ARTS, I.C.; THEUNISZ, E.H.; GEUSENS, P.; DAGNELIE, P.C. The P2X(7) loss-of-function Glu496Ala polymorphism affects *ex vivo* cytokine release and protects against the cytotoxic effects of high ATP-levels. **BMC Immunology**, v.13, n.64, p.1-9, dez., 2012.
- WESSELIUS, A.; BOURS, M.J.; HENRIKSEN, Z.; SYBERG, S.; PETERSEN, S.; SCHWARZ, P.; JORGENSEN, N.R.; VAN HELDEN, S.; DAGNELIE, P.C. Association of P2X7 receptor polymorphisms with bone mineral density and osteoporosis risk in a cohort of Dutch fracture patients. **Osteoporosis International**, v.24, n.4, p.1235-1246, abr., 2013.
- WASSMER, S.C., GRAU, G.E. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? **International Journal for Parasitology**, v.47, n.2-3, p.145-152, fev., 2017.
- WHITE, N.J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T.; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.A.; DONDORP, A.M. Malaria. **The Lancet**, v.383, n. 9918, p.723-735, fev., 2014.
- WHO. **Global technical strategy for malaria 2016–2030 2015b**. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/en/>. Acesso em: 25 set., 2016.
- WHO. **World Malaria Report 2014**. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/>. Acesso em: 25 ago., 2015.
- WHO. **World Malaria Report 2015**. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2015/en/>. Acesso em: 25 abr., 2016.
- WHO. **World Malaria Report 2016**. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>>. Acesso em: 23 jan., 2017.
- WHO. **World Malaria Report 2017**. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/en/>>. Acesso em: 23 abr., 2018.
- WHO. **World Malaria Report 2018**. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>>. Acesso em: 18 jan., 2019.
- WIKENHEISER, D.J.; GHOSH, D.; KENNEDY, B.; STUMHOFER, J.S. The Costimulatory Molecule ICOS Regulates Host Th1 and Follicular Th Cell Differentiation in Response to *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS Infection. **The Journal of Immunology**, v.196, n.2, p.778-791, jan., 2016.
- WOEHRLE, T.; YIP, L.; ELKHAL, A.; SUMI, Y.; CHEN, Y.; YAO, Y.; INSEL, P.A.; JUNGER, W.G. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. **Blood**, v.116, n.18, p.3475-3484, nov., 2010.
- WOODWARD, J. Bi-allelic SNP genotyping using the TaqMan® assay. **Methods in Molecular Biology**, v.1145, n.29, p.67-74, abr., 2014.

WU, J.; LU, L.; ZHANG, L.; DING, Y.; WU, F.; ZUO, W.; ZHANG, W. Single Nucleotide Polymorphisms in P2X7 Gene Are Associated with Serum Immunoglobulin G Responses to *Mycobacterium tuberculosis* in Tuberculosis Patients. **Disease Markers**, v.2015, n.671272, p.1-7, dez., 2015.

XU, H.; GONG, C.; HE, L.; RAO, S.; LIU, X.; NIE, Y.; LIU, C.; LI, T.; DING, L.; TU, Y.; YANG, Y.; HU, F.; FAN, Y.; WANG, H.; WANG, S.; XIONG, C.; ZHONG, P.; TANG, L.; LIANG, S. Purinergic P2X7 receptor functional genetic polymorphisms are associated with the susceptibility to osteoporosis in Chinese postmenopausal women. **Purinergic Signalling**, v.13, n.3, p.339-346, set., 2017.

ZANDER, R.A.; OBENG-ADJEI, N.; GUTHMILLER, J.J.; KULU, D.I.; LI, J.; ONGOIBA, A.; TRAORE, B.; CROMPTON, P.D.; BUTLER, N.S. PD-1 Co-inhibitory and OX40 Co-stimulatory Crosstalk Regulates Helper T Cell Differentiation and Anti-Plasmodium Humoral Immunity. **Cell Host & Microbe**, v.17, n.5, p.628-641, mai., 2015.

APÊNDICE A — P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. **PLOS Pathogens**, 2017.

RESEARCH ARTICLE

P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria

Érika Machado de Salles^{1*}, Maria Nogueira de Menezes¹, Renan Siqueira¹, Henrique Borges da Silva^{1,2}, Eduardo Pinheiro Amaral¹, Sheyla Inés Castillo-Méndez¹, Isabela Cunha¹, Alexandra dos Anjos Cassado¹, Flávia Sarmiento Vieira¹, David Nicholas Olivieri³, Carlos Eduardo Tadokoro⁴, José Maria Alvarez¹, Robson Coutinho-Silva^{5,6}, Maria Regina D'Império-Lima^{1*}

1 Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Department of Laboratory Medicine and Pathology, Center of Immunology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, United States, **3** Escuela Superior de Enseñanza Informática, Universidad de Vigo, Vigo, Spain, **4** Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil, **5** Programa de Imunobiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Pesquisa Translacional em Saúde e Meio Ambiente da Região Amazônica, Rio de Janeiro, Brazil

* erika.salles@gmail.com (EMS); relima@usp.br (MRDL).

OPEN ACCESS

Citation: Salles ÉMd, Menezes MNd, Siqueira R, Borges da Silva H, Amaral EP, Castillo-Méndez SI, et al. (2017) P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. PLoS Pathog 13(8): e1006595. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595>

Editor: Jean Langhorne, Francis Crick Institute, UNITED KINGDOM

Received: March 22, 2017

Accepted: August 21, 2017

Published: August 31, 2017

Copyright: © 2017 Salles et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) grants, 2010/51150-4, 2013/07140-2 and 2015/20432-8 (MRDL) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) grants, 303676/2014-0 and 448765/2014-4 (MRDL). EMS received a PhD fellowship from FAPESP (2011/

Abstract

A complete understanding of the mechanisms underlying the acquisition of protective immunity is crucial to improve vaccine strategies to eradicate malaria. However, it is still unclear whether recognition of damage signals influences the immune response to *Plasmodium* infection. Adenosine triphosphate (ATP) accumulates in infected erythrocytes and is released into the extracellular milieu through ion channels in the erythrocyte membrane or upon erythrocyte rupture. The P2X7 receptor senses extracellular ATP and induces CD4 T cell activation and death. Here we show that P2X7 receptor promotes T helper 1 (Th1) cell differentiation to the detriment of follicular T helper (Tfh) cells during blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. The P2X7 receptor was activated in CD4 T cells following the rupture of infected erythrocytes and these cells became highly responsive to ATP during acute infection. Moreover, mice lacking the P2X7 receptor had increased susceptibility to infection, which correlated with impaired Th1 cell differentiation. Accordingly, IL-2 and IFN γ secretion, as well as T-bet expression, critically depended on P2X7 signaling in CD4 T cells. Additionally, P2X7 receptor controlled the splenic Tfh cell population in infected mice by promoting apoptotic-like cell death. Finally, the P2X7 receptor was required to generate a balanced Th1/Tfh cell population with an improved ability to transfer parasite protection to CD4-deficient mice. This study provides a new insight into malaria immunology by showing the importance of P2X7 receptor in controlling the fine-tuning between Th1 and Tfh cell differentiation during *P. chabaudi* infection and thus in disease outcome.

11053-2). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Malaria still causes the death of approximately half a million people yearly despite efforts to develop vaccines. The ability of *Plasmodium* parasites to survive the immune effector mechanisms indicates how suitable the immune response must be to eliminate the infection. CD4 T cells have a dual role in protection against blood-stage malaria by producing IFN γ and helping B cells to secrete antibodies. Infected erythrocytes release adenosine triphosphate (ATP), a damage signal that can be recognized by purinergic receptors. Among them, the P2X7 receptor senses extracellular ATP and induces CD4 T cell activation and death. Here, we evaluated the role of P2X7 receptor in the CD4 T cell response during blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. We observed that the selective expression of P2X7 receptor in CD4 T cells was required for T helper 1 (Th1) cell differentiation, contributing to IFN γ production and parasite control. In contrast, we found an increase in follicular T helper (Tfh) cell population, germinal center reaction and anti-parasite antibody production in the absence of the P2X7 receptor. Our findings provide mechanistic insights into malaria pathogenesis by demonstrating the importance of damage signals for the fine-tuning between Th1 and Tfh cell populations and thus for the outcome of the disease.

Introduction

Despite efforts to develop vaccines and antimalarial drugs, *Plasmodium* infection still causes the death of about half a million people yearly [1]. The most prevalent *Plasmodium* species, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, persist for very long time periods in the bloodstream of infected individuals. Parasite persistence is also ensured by repeated re-infections in hyperendemic areas. Although the major clinical manifestations of the disease attenuate after a few malaria episodes, repeated exposure to the parasite over several years is required to control parasite population growth [2]. Furthermore, protective immunity is usually lost in the absence of continued exposure to the parasite [3]. The ability to survive the effector mechanisms of innate immunity and to evade the acquired immune response for long periods shows how difficult it is to combat malaria and how appropriate the immune response must be to eliminate the parasite. Therefore, a complete understanding of the mechanisms underlying the acquisition of protective immunity is crucial to improve vaccine strategies to eradicate malaria. Particularly concerning the stimulatory signaling required for optimal activation of CD4 T cells, which have a central role in protection against malaria by producing IFN γ and helping B cells to secrete antibodies [4], [5].

The intraerythrocytic cycle of *P. falciparum* and *P. vivax* has a synchronic periodicity and, consequently, the delivery of immune stimulatory molecules and subsequent fever episodes occur periodically after the rupture of infected red blood cells (iRBCs). It has been shown that parasite components, such as glycosylphosphatidylinositol (GPIs)-anchored molecules and DNA from *P. falciparum*, activate macrophages through the toll-like receptor (TLR)1/TLR2 and TLR9 signaling, respectively [6]. Nevertheless, it is still unclear whether recognition of damage signals contributes to activating the immune system in individuals suffering from malaria. During pathogenic infection and tissue injury, nucleic acids and their metabolites are released from dead cells and induce inflammatory and reparatory responses [7], [8]. Adenosine triphosphate (ATP) is released passively from necrotic cells and through pannexin-1 hemichannels from apoptotic cells [9]. ATP accumulates in iRBCs and is released into the

extracellular milieu through ion channels in the erythrocyte membrane or upon iRBC rupture [10], [11]. ATP is also released through pannexin-1 hemichannels in the immune synapsis formed between T cells and antigen presenting cells (APCs), triggering ATP-gated ionotropic P2X receptors that promote IL-2 secretion and T cell proliferation [12]. Unlike P2X1 and P2X4 receptors, which translocate into the immune synapsis, the P2X7 receptor remains uniformly distributed across the cell surface, allowing T cells to sense environmental ATP. The P2X7 receptor is activated only at high ATP concentrations [13], hence it may be particularly important to help T cells distinguish tissue-damaging infections from quiescent infections or reminiscent antigens from a previous infection. Transient P2X7 activation promotes T cell response due to the formation of a non-selective cation channel that allows calcium influx [14]. However, sustained signaling induces the formation of large transmembrane pores and, consequently, leads to loss of membrane integrity and T cell death [15].

Although P2X7 signaling has important consequences for T cell biology, few studies have addressed the direct effects of this signaling pathway on T cell fate *in vivo*. Interestingly, the *P2rx7* gene is highly expressed in follicular helper T cells (T_{fh}) located in Peyer's patches and the P2X7 receptor critically controls their numbers and, consequently, the production of IgA against gut commensals [16]. Increased *P2rx7* expression is also a feature of regulatory T cells (Treg cells); ATP stimulation inhibits Treg cell generation and suppressive activity through the P2X7 receptor [17]. Moreover, it has been shown that P2X7 activation by extracellular (eATP) can be abrogated by CD39 (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1), an ectoATPase that degrades ATP or adenosine diphosphate (ADP) to adenosine monophosphate (AMP). CD39 is constitutively expressed on Treg cell surface [18], providing protection against ATP-induced cell death [19]. CD39 and CD73 (ecto-5'-nucleotidase) also contribute to the suppressive activity of Treg cells [18]. CD73 hydrolyses extracellular AMP to adenosine, which is an important physiological regulator of the immune response [20].

In this study, we investigated using the blood-stage *Plasmodium chabaudi* (*Pc*) murine infection model whether P2X7 signaling contributes to CD4 T cell subset differentiation in malaria. The infection with synchronic *Pc* parasites develops from an acute phase to a long-lasting chronic phase, which accurately reproduces several aspects of human malaria [21]. IFN γ production is associated with the development of protective immunity [22], [23]. A major source of IFN γ during acute *Pc* infection is class II MHC (major histocompatibility complex)-restricted CD4 T cells, which also help B cells to secrete antibodies [24]. The complete elimination of chronic parasitemia and protection against reinfection require Th1 cells [25], [26], which are particularly important in ensuring long-term strain-transcending immunity [27]. A Th1 cell population co-expressing IFN γ and IL-10 also plays a key role in protecting against severe malaria pathology [28]. Furthermore, T_{fh} cells provide critical help to B cells to produce high affinity antibodies [29], [30], and have been the focus of recent studies in murine and human malaria [31]. T_{fh} cells are implicated in protection against both *Pc* and *Plasmodium yoelii* 17XNL parasites [32]–[34].

Our results suggest that P2X7 receptor is required for Th1 cell differentiation during *Pc* infection but it also controls the T_{fh} cell population. Using adoptive transfer experiments, we showed that the selective absence of the P2X7 receptor in CD4 T cells is sufficient to impair Th1 cell differentiation and increase the T_{fh} cell population. Evidencing the importance of the fine-tuning between Th1 and T_{fh} cell populations in the control of *Pc* infection, the balanced Th1/T_{fh} cell population that differentiated in the presence of P2X7 receptor displayed higher ability to transfer protection to CD4-deficient mice than the increased T_{fh} cell population developed in its absence. The present study adds novel information on the malaria immunology field by demonstrating the critical role of the P2X7 receptor for the outcome of *Pc* infection by promoting Th1 cell differentiation to the detriment of T_{fh} cells.

Results

P2X7 receptor plays opposing roles in the protection against *Pc* and *P. yoelii* 17XNL malaria

To investigate the participation of the P2X7 receptor in blood-stage *Pc* malaria, disease progression was evaluated in C57BL/6 (B6) and *P2rx7*^{-/-} mice. The absence of the P2X7 receptor led to a worsening of the disease in infected females and males. Infected *P2rx7*^{-/-} males showed higher parasitemias than their B6 counterparts, and 80% of the animals died during acute infection (Fig 1A and 1B). The disease developed similarly in both female groups up to day 7 p.i.; however, after this period, *P2rx7*^{-/-} mice had impaired parasitemia control and limited recovery of clinical parameters (i.e. anemia, weight loss and hypothermia) (Fig 1C). *P2rx7*^{-/-} females also exhibited higher chronic parasitemias than B6 females (Fig 1A).

To determine whether the protection induced by the P2X7 receptor is a general phenomenon in murine malaria, we assessed the course of *P. yoelii* 17XNL infection in B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. It has been shown previously that, in contrast to *Pc* infection, the lack of IFN γ modestly affects the control of *P. yoelii* 17XNL infection [35], whereas antibody deficiency leads to a lethal outcome [32]. Unlike the case of *Pc* malaria, more control of *P. yoelii* 17XNL parasites was observed in *P2rx7*^{-/-} mice than in B6 mice, apparent from day 9 to 20 p.i. when mice of both groups controlled the parasitemia (Fig 1D).

Taken together, we showed that *Pc* infection control relies on P2X7 signaling; instead, the presence of P2X7 signaling results in increased peak parasitemia during *P. yoelii* 17XNL infection. These results suggest that P2X7-mediated eATP sensing might play a role in controlling the balance between IFN γ - and antibody-mediated immune responses to malaria.

P2X7 receptor is required for CD4 T cell activation and antibody production during acute *Pc* malaria

To determine whether the amount of ATP released during iRBC lysis is sufficient for P2X7 activation, P2X7-associated pore formation was evaluated by ethidium bromide (EB) uptake in blood CD4 T cells, which were obtained before and after iRBC lysis during a synchronized parasite cycle (S1A Fig). This assay explores the P2X7-mediated formation of large transmembrane pores after sustained ATP stimulation, which allows EB to enter the cell and stain the nucleus [13]. The EB staining in B6 CD4 T cells was increased after the rupture of iRBCs at 4 and 5 days p.i., and this effect was abolished in *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells (Fig 2A). Accordingly, higher ATP serum levels were detected after iRBC lysis (S1B Fig). The effects of acute *Pc* infection on the splenic CD4 T cell response to eATP were then assessed *in vitro* at 4 and 7 days p.i., representing the interval between CD4 T cell proliferation and IFN γ secretion [24]. A marked increase in ATP-induced P2X7-mediated pore formation was observed in CD4 T cells at 4 days p.i. compared with that in non-infected controls (Fig 2B). Although the B6 CD4 T cell response to ATP was drastically reduced at day 7 p.i. compared with that at day 4 p.i., it remained augmented in relation to that of non-infected controls.

The splenic CD4 T cell response to *Pc* infection was then compared in B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. CD4 T cells at day 4 p.i. were stimulated *in vitro* with iRBCs, mimicking the *in vivo* condition in which parasite antigens are available along with ATP released by the iRBCs; the responses were evaluated after 72 h of culture, a time point that corresponds to peak proliferation and IFN γ production [24]. *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells proliferated less than B6 CD4 T cells in the presence of iRBCs and splenocytes from naïve nude mice, as a source of APCs expressing the P2X7 receptor (Fig 2C). IFN γ production was also reduced in iRBC-stimulated *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells, whereas IL-10 was produced at low levels regardless of P2X7 expression (Fig 2D).

Fig 1. Parasitemia and clinical parameters in B6 and *P2rx7*^{-/-} mice infected with *Pc* and *P. yoelii* 17NL parasites. (A–C) B6 and *P2rx7*^{-/-} mice were infected with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 4–5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) B6 and *P2rx7*^{-/-} groups with $p < 0.05$, using (A and C) the Mann Whitney U test or (B) the long-rank test. (A) Parasitemia curves are shown. (B) Survival curves are shown. (C) Hemoglobin serum (Hb) concentration, body weight and body temperature were monitored daily. Variation in body weight relative to day 0 is shown. (D) B6 and *P2rx7*^{-/-} mice were infected with 1×10^5 *P. yoelii* 17XNL-iRBCs. The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 4–5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) B6 and *P2rx7*^{-/-} groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test. Parasitemia curves are shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595.g001>

The treatment with apyrase (ATP diphosphohydrolase) or brilliant blue G (BBG, P2X7 antagonist) inhibited CD4 T cell proliferation and IFN γ production, confirming the involvement of ATP and P2X7 receptor (S2A and S2B Fig). Accordingly, the lack of the P2X7 receptor drastically impaired the *in vivo* expansion of the splenic CD4 T cell population during acute *Pc* infection (Fig 2E). Moreover, at 7 days p.i., the IFN γ ⁺CD4⁺ cell number per spleen was higher in B6 mice than in *P2rx7*^{-/-} mice (Fig 2F). Explaining the gender influence in the susceptibility to

Fig 2. Splenic CD4 T cell responses in acutely infected B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. (A-G) B6 and *P2rx7*^{-/-} mice were analyzed at 4, 5 and 7 days p.i. with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. Naïve mice were used as controls (day 0). Female mice were used in the experiments with the exception that females and males were compared. The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3-4$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant). (A) EB-stained CD4⁺ blood cell percentages were determined by flow cytometry, before and after iRBC rupture. The blood samples were collected at 9 a.m. ($1.3 \pm 0.3\%$ iRBCs at 4 days p.i. and $7.6 \pm 0.3\%$ iRBCs at 5 days p.i.; $>95\%$ trophozoites and schizonts) and 2 p.m. ($7.3 \pm 1.2\%$ iRBCs at 4 days p.i. and $15.0 \pm 3.7\%$ iRBCs at 5 days p.i.; $>95\%$ ring forms). (B) Splenocytes were stimulated or not with 25–500 μ M ATP. EB-stained CD4⁺ cell percentages were determined by flow cytometry. Horizontal gray bar represents the confidence interval obtained with *P2rx7*^{-/-} cells. (C) CFSE-stained CD4⁺ cells and APCs (splenocytes from naïve nude mice), at a 1:1 ratio, were stimulated or not with iRBCs (1 splenocyte/ 4 iRBCs). Histograms show CFSE-stained CD4⁺ cells. CFSE^{lo}CD4⁺ cell percentages are shown in the column bar graph. (D) Splenocytes were stimulated or not with iRBCs (1 splenocyte/ 3 iRBCs). Contour plots show intracellular IFN- γ and IL-10-stained CD4⁺ cells. IFN- γ ⁺IL-10⁻ and IFN- γ ⁺IL-10⁺ cell percentages in CD4⁺ cells are shown in the column bar graphs. (E) CD4⁺ cell numbers per spleen were determined by flow cytometry. (F) IFN- γ ⁺CD4⁺ and IL-10⁺CD4⁺ cell numbers per spleen were determined by flow cytometry. (G) IgM-, IgG2c- and IgG1-secreting cell numbers per spleen were determined by ELISPOT assay.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595.g002>

acute *Pc* infection, B6 and *P2rx7*^{-/-} males had lower IFN γ ⁺CD4⁺ cell numbers per spleen at day 7 p.i. than female counterparts; the lowest IFN γ levels were observed for *P2rx7*^{-/-} males. The IL-10⁺CD4⁺ cell numbers were comparable in infected B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. The immunoglobulin secretion was also reduced in acutely infected *P2rx7*^{-/-} mice compared with that in their B6 counterparts, characterized by a predominance of IgM- and IgG2c-secreting cells (Fig 2G) as previously reported [36].

Together, this data shows that P2X7 signaling at the time of *Pc*-iRBC rupture is sufficient to induce pore formation in blood CD4 T cells. They also reveal the importance of the P2X7 receptor for optimal CD4 T cell function during acute *Pc* infection.

P2X7 receptor influences the early stages of Th1/Tfh cell differentiation during *Pc* malaria

The low CD4 T cell proliferation in acutely infected *P2rx7*^{-/-} mice could explain their reduced IFN γ and antibody responses. However, P2X7 deficiency could also impair Th1 cell differentiation in addition to preventing CD4 T cell expansion. To evaluate this possibility, we next examined whether the P2X7 receptor influences Th1/Tfh cell differentiation during early *Pc* infection. Splenic CD4 T cells were analyzed according to the expression of the transcription factors T-bet and B cell lymphoma 6 (Bcl6), which are reciprocal regulators of Th1 and Tfh cell lineage commitment [37], [38]. At day 4 p.i., a small percentage increase in CD4 T cells expressing both T-bet and Bcl6 was observed in B6 and *P2rx7*^{-/-} mice (S3A Fig). By contrast, around 40% of the B6 CD4 T cells at 7 days p.i. showed high amounts of these transcription factors, evidenced by two distinct cell subsets (Fig 3A and S3B Fig). The proportion of T-bet^{hi}Bcl6^{lo} cells was reduced in the absence of the P2X7 receptor, while that of T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cells was augmented. However, considering the low numbers of CD4 T cells per spleen in *P2rx7*^{-/-} mice at day 7 p.i. (Fig 2E), P2X7 deficiency led to a decrease in the T-bet^{hi}Bcl6^{lo} cell population, but did not affect the T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cell population. Both CD4 T cell subsets showed higher expression of programmed cell death-1 (PD1) and C-X-C chemokine receptor type 5 (CXCR5) than CD4 T cells from non-infected mice (Fig 3B). However, PD1 expression in these cells at day 7 p.i. was lower than that in fully differentiated Tfh cells at 20 days p.i. (S3C Fig). Both T-bet^{hi}Bcl6^{lo} and T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cells from infected B6 mice also expressed high levels of the transcription factor B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) (Fig 3C, left panels), which is a strong negative regulator of Tfh cell differentiation [37]. Lower Blimp-1 expression was observed for both CD4 T cell subsets in the absence of P2X7 receptor. We also assessed the expression of IL-2 receptor α (CD25) and β (CD122) chains; effector memory Th1 cells are produced from early CD4 T cell population expressing this receptor in *L. monocytogenes* infection [39]. Both CD25 and CD122 were preferentially increased in T-bet^{hi}Bcl6^{lo} cells than in T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cells from infected B6 mice; these molecules were expressed at lower levels in T-bet^{hi}Bcl6^{lo} cells from infected *P2rx7*^{-/-} mice (Fig 3C, middle and right panels). At 7 days p.i., the Foxp3⁺CD4 T cell population showing high CD25 and CD122 levels was also reduced in *P2rx7*^{-/-} mice compared with that in B6 mice (S3D and S3E Fig).

Because the P2X7 receptor significantly affected the Th1 and Tfh cell counterbalance during acute *Pc* malaria, we then evaluated the P2X7 expression in B6 CD4 T cells. We also assessed the expression of CD39 ecto-nucleotidase, which can down-regulate P2X7 signaling by degrading eATP [18]. The P2X7 and CD39 levels were increased at 4 days p.i. in T-bet⁺Bcl6⁺ cells but not in T-bet⁻Bcl6⁻ cells (S3F Fig). Remarkably, at 7 days p.i., the P2X7 receptor was mostly expressed in T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cells, whereas T-bet^{hi}Bcl6^{lo} cells exhibited considerably more CD39 (Fig 3D). In fact, two different CD4 T cell populations were identified at 7 days p.i.

Fig 3. Phenotypic characterization of splenic CD4 T cells expressing T-Bet and Bcl6 in acutely infected B6 and *P2rx7^{-/-}* mice. (A-E) B6 and *P2rx7^{-/-}* female mice were analyzed at 7 days p.i. with 1×10^6 *Plasmodium* (Pc)-iRBCs. Naive mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using (A and D) the Mann-Whitney U test and (C) Kruskal-Wallis test (NS, not significant). (A) Contour plots show T-bet and Bcl6 expression in CD4⁺ cells. The gates were drawn using isotype controls (S3B Fig). T-bet^{hi}Bcl6^{lo} and T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cell percentages in CD4⁺ cells and CD4⁺ cell numbers per spleen are shown in the column bar graphs. (B) Dot plots show PD1 and CXCR5 expression in CD4⁺ cells. (C) Histograms show Blimp-1, CD25 and CD122 expression in CD4⁺ or Foxp3⁺CD4⁺ (to exclude regulatory T cells), T-bet^{hi}Bcl6^{lo}CD4⁺, T-bet^{lo}Bcl6^{hi}CD4⁺ and T-bet^{lo}Bcl6^{lo}CD4⁺ cells. Fluorescence minus one (FMO) and isotype controls are shown in the histograms. The means of fluorescence intensity (MFIs) of Blimp-1, CD25 and CD122 expression are shown in the column bar graphs. (D) Histograms show P2X7 and CD39 expression in CD4⁺, T-bet^{hi}Bcl6^{lo}CD4⁺, T-bet^{lo}Bcl6^{hi}CD4⁺ and T-bet^{lo}Bcl6^{lo}CD4⁺ cells. The MFIs of P2X7 and CD39 expression are shown in the column bar graphs. (E) Dot plot shows P2X7 and CD39 expression in CD4⁺, T-bet^{hi}Bcl6^{lo}CD4⁺ and T-bet^{lo}Bcl6^{hi}CD4⁺ cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595.g003>

according to P2X7 and CD39 expression: the $P2X7^{lo}CD39^{hi}$ (T-bet^{hi}Bcl6^{lo}) and $P2X7^{hi}CD39^{lo}$ (T-bet^{lo}Bcl6^{hi}) subsets (Fig 3E).

In summary, P2X7 deficiency impairs the Th1 cell differentiation from the onset of *Pc* infection. This effect was counterbalanced by a percentage increase of T-bet^{lo}Bcl6^{hi} CD4 T cells.

Lack of P2X7 receptor leads to enhanced antibody response during chronic *Pc* malaria

The early increase in the proportion of T-bet^{lo}Bcl6^{hi} CD4 T cells in infected $P2rx7^{-/-}$ mice motivated a careful examination of the development of Tfh cells during chronic *Pc* malaria. First, we observed hyperplasia of splenic secondary lymphoid follicles in the absence of the P2X7 receptor (Fig 4A). Confocal microscopy analysis of these follicles at 20 days p.i. revealed many CD4 T cells in extensive GL7-stained germinal centers (Fig 4B). Consistently, at 20 and 30 days p.i., $P2rx7^{-/-}$ mice showed higher B cell numbers per spleen, including germinal center (Fas⁺GL7⁺CD19⁺) B cells (Fig 4C). P2X7 deficiency also led to the development of an increased Tfh cell population that was identified by the expression of inducible T cell co-stimulation (ICOS), CXCR5, PD1 and Bcl6 (Fig 4D). Remarkably, a prominent Tfh cell response occurred at 14 days p.i. in $P2rx7^{-/-}$ mice yielding an earlier peak of Tfh cell numbers than in B6 mice; the Tfh cell population remained augmented in $P2rx7^{-/-}$ mice until day 100 p.i. (Fig 4E). We also evaluated the IL-21 production, which is a Tfh cell signature and contributes to functional Tfh cell generation in *Pc* malaria [33]. Following stimulation *in vitro* with iRBCs, $P2rx7^{-/-}$ splenocytes at 20 days p.i. produced higher amounts of IL-21 than B6 counterparts (Fig 4F). Furthermore, the serum concentrations of anti-parasite IgM at 30 days p.i. and IgG2c at 50 days p.i. were higher in $P2rx7^{-/-}$ mice than in B6 mice (Fig 4G). This data suggests that P2X7 signaling controls the Tfh cell population and anti-parasite antibody production during chronic *Pc* infection.

Th1 cell response is impaired in chronically infected $P2rx7^{-/-}$ mice

The higher parasitemias observed in chronically infected $P2rx7^{-/-}$ mice compared with those of their B6 counterparts suggested that the P2X7 receptor is required for the development of acquired immunity to *Pc* malaria. Because of the key role of Th1 cells in complete parasite elimination [25]–[27], the splenic CD4 T cell response was also analyzed in chronically infected B6 and $P2rx7^{-/-}$ mice. The amounts of additional ATP required to induce P2X7-mediated pore formation in B6 CD4 T cells were still lower at 20 and 30 days p.i. compared to that in non-infected mice, returning to control levels at 50 days p.i. (Fig 5A). Unlike in acute infection, higher CD4 T cell numbers per spleen were observed in $P2rx7^{-/-}$ mice than in B6 mice during chronic infection (Fig 5B). The analysis of CD4 T cell subsets, as previously defined [26], revealed larger populations of effector (T_E), effector memory (T_{EM}) and central memory (T_{CM}) cells in chronically infected $P2rx7^{-/-}$ mice (S4A Fig). Despite these increases, the lack of the P2X7 receptor impaired IFN γ secretion, without affecting IL-10 secretion, as observed during acute *Pc* infection (Fig 5C). Most IFN γ - and IL-10-producing cells exhibited a T_{EM} cell phenotype at 20 days p.i. (S4B Fig). Concordantly, reduced amounts of IFN γ , but not of IL-10, were detected in the supernatants of iRBC-stimulated $P2rx7^{-/-}$ splenocytes at 30 days p.i. (Fig 5D). Furthermore, ATP stimulation of B6 splenocytes boosted P2X7-dependent IFN γ production and inhibited P2X7-independent IL-10 production.

Subsequently, we investigated whether the P2X7 receptor is required to induce and/or maintain T-bet expression in splenic CD4 T cells from chronically infected mice. CD4 T cells from B6 mice maintained high expression of this transcription factor at 20 and 30 days p.i.

Fig 4. Splenic Tfh cell responses in infected B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. (A–G) B6 and *P2rx7*^{-/-} female mice were analyzed at 7, 14, 20, 30, 50, 100 and 130 days p.i. with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. Naïve mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3–5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) B6 and *P2rx7*^{-/-} groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant). (A) Hematoxylin-eosin stained sections show splenic follicular hyperplasia in *P2rx7*^{-/-} mice (40x magnification; bar scales correspond to 200 μ m). (B) The mean areas of lymphoid follicles are shown. (C) Confocal immunofluorescence images (100x magnification; bar scales correspond to 400 μ m) of splenic sections are shown. Tissue slices were stained for CD19 (green), CD4 (red) and GL7 (blue). (D) CD19⁺ and Fas⁺GL7⁺CD19⁺ cell numbers per spleen were determined by flow cytometry. (E) Contour plots show PD1, ICOS and Bcl6 versus CXCR5 expression in CD4⁺ cells. PD1⁺CXCR5⁺CD4⁺, ICOS⁺CXCR5⁺CD4⁺ and Bcl6⁺CXCR5⁺CD4⁺ cell numbers per spleen are shown in the column bar graphs. (F) PD1⁺CXCR5⁺CD4⁺ cell numbers per spleen were determined by flow cytometry. (G) IL-21 concentrations were determined by ELISA in the supernatants of splenocytes stimulated or not with iRBCs (splenocyte/3 iRBCs). (H) Anti-parasite IgM and IgG2c serum concentrations were determined by ELISA.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595.g004>

while *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells did not (Fig 5E). Furthermore, B6 CD4 T cells at 20 days p.i. co-expressed T-bet and P2X7 receptor (Fig 5F). At 30 days p.i., T-bet up-regulation was observed in B6 CD4 T_{E/EM} and T_{CM} cells but not in *P2rx7*^{-/-} counterparts (S5A Fig). The B6 T_{E/EM} and T_{CM} cells also exhibited high P2X7 levels at day 20 p.i. (S5B Fig). These results indicate that P2X7 receptor is required for the Th1 cell response during chronic *Pc* malaria.

P2X7 receptor mediates Tfh cell death during chronic *Pc* malaria

One explanation for our previous results is that P2X7 signaling promotes Th1 cell differentiation to the detriment of Tfh cell differentiation during blood-stage *Pc* malaria by inducing the expression of T-bet, rather than Bcl6. Alternatively, but not mutually exclusive, P2X7 signaling could mediate splenic Tfh cell death as described for Peyer's patches [16]. Therefore, we examined whether splenic Tfh cells at day 20 p.i. were susceptible to ATP-induced cell death. Using the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay [40], we identified apoptotic cells mostly in the spleen of B6 mice than of *P2rx7*^{-/-} mice at 20 days p.i. (Fig 6A). Aggregates of TUNEL⁺ cells were seen in the lymphoid follicles. Furthermore, at 20 days p.i., lower percentages of hypodiploid nuclei were detected in *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells than in B6 CD4 T cells (Fig 6B). Because phosphatidylserine (PS) exposure precedes P2X7-mediated T cell death [15], annexin V staining was also compared in Tfh and non-Tfh cells. In infected B6 mice, most Tfh cells were labeled with annexin V, whereas non-Tfh cells were mainly negative (Fig 6C). Lower annexin V staining was observed in *P2rx7*^{-/-} Tfh cells than in B6 Tfh cells, but Tfh cells still presented higher labeling than non-Tfh cells in the absence of P2X7 receptor. Based on the results of Aqua Live/Dead staining, most annexin V⁺ Tfh cells maintained membrane integrity (Fig 6D). However, after 2 h in culture, a large proportion of B6 Tfh cells died spontaneously as evidenced by the co-expression of annexin V and Aqua Live/Dead staining (Fig 6E). This process was mediated by the P2X7 receptor and increased in the presence of 300 μ M ATP. In contrast, most non-Tfh cells remained alive even following ATP stimulation. Additionally, ATP-induced P2X7-mediated pore formation was observed mostly in Tfh cells compared with non-Tfh cells (Fig 6F).

In order to determine the mechanism responsible for the greater sensitivity of Tfh cells to eATP, we evaluated P2X7 and CD39 expression in Tfh and non-Tfh cells from chronically infected B6 mice. At 20 days p.i., Tfh cells exhibited higher levels of P2X7 receptor than non-Tfh cells and T_{E/EM} cells (Fig 6G), which contained both non-Tfh cells and Tfh cells (S5C Fig). Of note, a direct correlation between P2X7 and PD1 expression seems to occur in B6 CD4 T cells. Furthermore, two distinct CD39⁺ CD4 T cell subsets were identified in chronically infected B6 mice; PD1^{hi}CXCR5⁺CD39^{lo} (Tfh) cells expressed more P2X7 receptor than CXCR5⁺CD39^{hi} (non-Tfh) cells (Fig 6H).

Because T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cells at day 7 p.i. also expressed a P2X7^{hi}CD39^{lo} phenotype (Fig 3G), we wondered if the early stages of Tfh cell differentiation were also susceptible to ATP-induced

Fig 5. Splenic Th1 cell responses in chronically infected B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. (A-F) B6 and *P2rx7*^{-/-} female mice were analyzed at 20, 30 and 50 days p.i. with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. Naïve mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3-5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant). (A) Splenocytes were stimulated or not with 25–500 μM ATP. EB-stained CD4⁺ cell percentages were determined by flow cytometry. Horizontal gray bar represents the confidence interval

obtained with *P2rx7*^{-/-} cells. (B) CD4⁺ cell numbers per spleen were determined by flow cytometry. (C) Splenocytes were stimulated or not with iRBCs (1 splenocyte/ 3 iRBCs). IFN γ ⁺IL-10⁻, IFN γ ⁺IL-10⁺ and IFN γ ⁻IL-10⁺ cell percentages in CD4⁺ cells were determined by flow cytometry. (D) IFN γ and IL-10 concentrations were determined by ELISA in the supernatants of splenocytes described in E, which were stimulated or not with 100–300 μ M ATP. (E) Histograms show T-bet expression in CD4⁺ cells. FMO controls are shown in the histograms. The MFIs of T-bet expression are shown in the scatter plots. (F) Contour plots show T-bet and P2X7 expression in CD4⁺ cells. T-bet⁺P2X7⁺ cell percentages in CD4⁺ cells are shown in the column bar graph.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595.g005>

cell death. In fact, a higher proportion of T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cells died spontaneously after 2 h in culture compared with that of T-bet^{hi}Bcl6^{lo} cells, a phenomenon that was also observed in the presence of 300 μ M ATP. (Fig 6I).

These results indicate that P2X7-mediated cell death contributes to control the Tfh cell response during chronic *Pc* malaria. The high expression of the P2X7 receptor concomitantly with low CD39 levels explains the great sensitivity of the Tfh cell lineage to eATP.

The P2X7 deficiency in CD4 T cells impairs Th1 cell differentiation and increases the Tfh cell population

To verify whether P2X7 expression in CD4 T cells is required for Th1 cell differentiation during *Pc* malaria, splenic CD4 T cells were sorted from naïve B6 or *P2rx7*^{-/-} donors and transferred into *Cd4*^{-/-} recipients that were infected with *Pc* parasites a week later (Fig 7A). The treatment with subcurative doses of chloroquine controlled parasitemias at comparable levels in both mouse groups (Fig 7B). A similar increase in CD4 T cell numbers per spleen was observed in these mice at 30 days p.i. (S6A Fig). Nevertheless, *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells generated lower numbers of T_{EM} and T_{CM} cells than B6 CD4 T cells (S6B Fig). Demonstrating the role of P2X7 signaling for the early CD4 T cell activation during acute *Pc* malaria, higher cytosolic calcium levels were observed at 7 days p.i. in B6 CD4 T cells compared with *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells (Fig 7C). Impaired IL-2 and IFN γ production accompanied the lower cytosolic calcium levels in *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells (Fig 7D and 7E). In line with these findings, at 7 and 30 days p.i., T-bet up-regulation was observed in B6 CD4 T cells but not in *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells (Fig 7F). Supporting the concept that P2X7 signaling changes the Th1/Tfh cell balance during *Pc* malaria, the Tfh cell population was significantly increased when CD4 T cells lacked the P2X7 receptor (Fig 7G).

Next, we examined how B6 and *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells differentiate in the same environment after *Pc* infection. Therefore, *Cd4*^{-/-} mice co-transferred with B6 (CD45.1) and *P2rx7*^{-/-} (CD45.2) CD4 T cells were infected with *Pc* parasites a week later (Fig 8A). At 30 days p.i., similar numbers of B6 and *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells were observed in the spleen (Fig 8B). Consistent with our previous results, the proportion of PD1^{lo}CD39^{hi} CD4 T cells was greater in the B6 population, whereas PD1^{hi}CD39^{lo} CD4 T cells predominated in the *P2rx7*^{-/-} population (Fig 8C). For the B6 and *P2rx7*^{-/-} populations, PD1^{lo}CD39^{hi} and PD1^{hi}CD39^{lo} CD4 T cell subsets showed higher T-bet and Bcl6 expression, respectively (Fig 8D). In conclusion, P2X7 expression in CD4 T cells is sufficient to promote Th1 cell differentiation over Tfh cells during *Pc* malaria.

The balanced Th1/Tfh cell population generated from B6 CD4 T cells confers better protection against *Pc* malaria

Our previous results indicate that P2X7 expression in CD4 T cells is critical for generating a balanced Th1/Tfh cell population during chronic *Pc* malaria, while an increased Tfh cell population develops in the absence of P2X7 receptor. To assess the consequences of that for

Fig 6. P2X7-mediated Tfh cell death and ATP sensitivity in infected B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. (A–I) B6 and *P2rx7*^{-/-} female mice were analyzed at 7 and 20 days p.i. with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. Naïve mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3–5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using (B, C, E and F) the Mann Whitney U test and (G and I) the Kruskal-Wallis test (NS, not significant). (A) Immunofluorescence images (40x magnification; bar scales correspond to 200 μ m) of splenic sections were obtained using TUNEL assay. (B) Histograms show propidium iodide (PI) incorporation in CD4⁺ cells. Hypodiploid nucleus percentages in CD4⁺ cells are shown in the column bar graph. (C) Histograms show annexin V staining in PD1^{hi}CXCR5⁺CD4⁺ and PD1⁺CD4⁺ cells. The MFIs of annexin V staining are shown in the column bar graphs. (D) Contour plots show PD1^{hi}CXCR5⁺CD4⁺ and PD1⁺CD4⁺ cells, which were stained for annexin V and Aqua Live/Dead reagent. (E) Contour plots show PD1^{hi}CXCR5⁺CD4⁺ and PD1⁺CD4⁺ cells, which were stained for annexin V and Aqua Live/Dead reagent. Cells were cultured for 2 h with or without 300 μ M ATP. (F) Splenocytes were stimulated or not with 100–500 μ M ATP. Histograms show EB-stained PD1^{hi}CXCR5⁺CD4⁺ and PD1⁺CD4⁺ cells. EB-stained CD4⁺ cell percentages are shown in the line graph. Horizontal gray bar represents the confidence interval obtained with *P2rx7*^{-/-} cells. (G) Dot plot shows PD1 and P2X7 expression in CD4⁺ cells. The MFIs of P2X7 expression in PD1^{hi}CXCR5⁺CD4⁺, PD1^{lo}CD4⁺, PD1⁺CD4⁺, CD4⁺ and CD44⁺CD62L⁺CD4⁺ cells are shown in the column bar graph. (H) Contour plots show CXCR5 and CD39 expression in CD4⁺ cells, and PD1 and CXCR5 expression in CXCR5⁺CD39^{lo}CD4⁺ or CXCR5⁺CD39^{hi}CD4⁺. Histograms show P2X7 expression in PD1^{hi}CXCR5⁺CD39^{lo}CD4⁺, CXCR5⁺CD39^{hi}CD4⁺, CXCR5⁺CD39^{lo}CD4⁺ and CD4⁺ cells. (I) Histograms show Aqua Live/Dead staining in CD4⁺, T-bet^{hi}Bcl6^{lo}CD4⁺ and T-bet^{lo}Bcl6^{hi}CD4⁺ cells. Aqua Live/Dead⁺ cell percentages are shown in the column bar graph.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595.g006>

protective immunity, splenic CD4 T cells from B6 or *P2rx7*^{-/-} mice at day 20 p.i. were transferred into *Cd4*^{-/-} recipients that were infected with *Pc* parasites (Fig 8E). *Cd4*^{-/-} mice transferred with naïve B6 CD4 T cells were used as controls. Significantly lower first and second parasitemia peaks were observed in *Cd4*^{-/-} mice transferred with B6 CD4 T cells at day 20 p.i. compared with those transferred with *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells at day 20 p.i. (Fig 8F). Notably, *Cd4*^{-/-} mice transferred with naïve B6 CD4 T cells or *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells at day 20 p.i. failed to control recrudescence parasitemia up to a month of infection. We concluded that the balanced Th1/Tfh cell population that develops in infected B6 mice is more efficient in controlling the first and second parasitemia peaks than the increased Tfh cell population generated in infected *P2rx7*^{-/-} mice.

Discussion

The P2X7 receptor has been implicated in both the protection and exacerbation of infectious diseases by inducing the activation and death of infected macrophages [41–43]. An important concept that emerges from our study is that eATP recognition by P2X7 receptor promotes the differentiation of Th1 cells to the detriment of Tfh cells during *Pc* malaria and thus contributes to protection. The first evidence in this direction was the susceptibility pattern of *P2rx7*^{-/-} mice that closely resembled the one previously described for IFN γ deficiency, in which most males died during acute *Pc* infection and females developed increased acute and chronic parasitemia [23]. The immunosuppressive effects of testosterone in the production of and response to cytokines were implicated in the higher susceptibility of male IFN γ ^{-/-} mice to *Pc* parasites, a phenomenon that was recapitulated in *P2rx7*^{-/-} males due to their extremely low Th1 response.

The eATP concentrations following iRBC rupture achieved, at least in some microenvironments, the threshold required for P2X7 activation in CD4 T cells, as observed for other pathological processes [44], [45]. Furthermore, splenic CD4 T cells became highly responsive to eATP at the beginning of *Pc* infection, which may have contributed to amplifying the early lymphocyte response. Indeed, the P2X7 receptor was important for CD4 T cell proliferation and IFN γ production during acute *Pc* malaria and consequently for IgM and IgG2c secretion that depends, at least partially, on CD4 T cell help [24]. Both IFN γ and low-affinity antibodies participate in the control of acute *Pc* malaria [22], [23], [46]. The P2X7 expression was also critical for IFN γ production during chronic disease. This finding corroborates our previous studies suggesting that a Th1 response is required, together with anti-parasite antibodies, to

Fig 7. Splenic Th1 and Tfh cell differentiation in *Cd4*^{-/-} mice adoptively transferred with B6 or *P2rx7*^{-/-} CD4 cells and infected with *Pc* parasites. (A–G) Naïve CD4⁺ cells from B6 and *P2rx7*^{-/-} female mice were transferred into *Cd4*^{-/-} female mice that were infected with 1 × 10⁶ *Pc*-iRBCs 7 days later. Splenic CD4⁺ cells were analyzed at 7 and 30 days p.i. Non-infected mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means ± SD (n = 3–5) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) B6 and *P2rx7*^{-/-} groups with *p* < 0.05, using the Mann Whitney U test (NS, not significant). (A) A schematic illustration of the experimental protocol is shown. (B) Parasitemia curves are shown. Arrows indicate the days of chloroquine treatment. (C) Immunofluorescence images (100x magnification bar scales correspond to 100 μm) showing cytosolic calcium levels in purified CD4⁺ cells were obtained using the calcium flux assay. (F) The mean corrected total cell fluorescence (CTCF) of CD4⁺ cells

are shown. (D) Dot plots show IL-2-secreting CD4⁺ cells. IL-2-secreting CD4⁺ cell numbers per spleen are shown in the column bar graph. (E) Contour plots show intracellular IFN γ -stained CD4⁺ cells. IFN γ ⁺CD4⁺ cell numbers per spleen are shown in the column bar graph. (F) Histograms show T-bet expression in CD4⁺ cells. FMO controls are shown in the histograms. The MFIs of T-bet expression are shown in the column bar graphs. (G) Contour plots show PD1 and Bcl6 *versus* CXCR5 expression in CD4⁺ cells. PD1⁺CXCR5⁺CD4⁺ and Bcl6⁺CXCR5⁺ cell percentages in CD4⁺ cells are shown in the column bar graphs.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595.g007>

resolve a persistent *Plasmodium* infection [25], [27]. Moreover, the inflammatory response may be further potentiated during *Pc* infection by the inhibitory effect of eATP on IL-10 secretion, which was shown here to be independent of the P2X7 receptor.

In addition to the important contribution of the P2X7 receptor in boosting the CD4 T cell response during acute *Pc* malaria, P2X7 signaling was critical for driving Th1/Tfh cell differentiation. On day 4 p.i., CD4 T cells had apparently not yet been committed on Th1 and Tfh cell lineages because there was only a small population expressing both T-bet and Bcl6. However, the two subsets could clearly be distinguished at 7 days p.i. by the preferential expression of T-bet, CD25, CD122 and CD39 in Th1-biased cells and Bcl6 and P2X7 receptor in Tfh-biased cells; P2X7 deficiency reduced the proportion of T-bet^{hi}Bcl6^{lo} cells and augmented that of T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cells. In line with these findings, a single-cell RNA seq analysis of Th1/Tfh cell differentiation during acute *Pc* malaria showed that these subsets emerge in parallel by day 7 p.i.; *Entpd1* (CD39) and *P2rx7* expression was identified as Th1 and Tfh signature, respectively [47]. To explain our data showing low antibody production in acutely infected *P2rx7*^{-/-} mice, we considered the possibility that T-bet^{hi}Bcl6^{lo} and T-bet^{lo}Bcl6^{hi} cell subsets could provide help for B cells at the early *Pc* infection; P2X7 deficiency reduced only the T-bet^{hi}Bcl6^{lo} cell population. Supporting this idea, both subsets displayed an early Tfh phenotype expressing CXCR5 and PD1 at levels below those of fully differentiated Tfh cells.

During chronic *Pc* malaria, there was a sharp expansion of the Tfh cell population in *P2rx7*^{-/-} mice that resulted in higher serum levels of anti-parasite IgM and IgG2c than in the B6 counterparts. The persistence of Th1 bias in chronically infected B6 mice was evidenced by T-bet and P2X7 co-expression in T_{E/EM} and T_{CM} cells; however, CD4 T cells from *P2rx7*^{-/-} mice did not express this transcription factor. Of note, the selective absence of the P2X7 receptor in CD4 T cells was sufficient to change the Th1/Tfh cell balance. This effect was shown in mice transferred with either *P2rx7*^{-/-} or B6 CD4 T cells in which parasitemia was maintained at similar levels by drug treatment, as well as in mice co-transferred with both CD4 T populations. In both experimental conditions, there was no apparent competitive advantage between the *P2rx7*^{-/-} and B6 CD4 T cell populations that displayed similar sizes a month after infection. P2X7 deficiency in CD4 T cells resulted in a lower increase in the T_E, T_{EM} and T_{CM} cell populations a month after infection. The opposing effect obtained in chronically infected *P2rx7*^{-/-} mice may be a consequence of higher parasitemia found in these animals in relation to chronically infected B6 mice.

The P2X7 signaling can influence Th1/Tfh cell differentiation by inducing the T-bet-controlled Th1 cell program, which hinders the development of the Bcl6-controlled Tfh cell program. In fact, P2X7 deficiency led to lower expression of Blimp-1 in CD4 T cells and this transcription factor is a known antagonist of Bcl6 [37]. It is generally accepted that P2X7 signaling in T cells amplifies T cell receptor (TCR)-induced calcium influx and thus increases IL-2 secretion [48], [49]. Accordingly, calcium influx and IL-2 secretion were dependent on P2X7 expression in CD4 T cells from acute *Pc* malaria. Furthermore, it has been shown that eATP is required for IL-2 and IFN γ secretion by antigen-specific T cells [50]. IL-2 induces the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in CD4 T cells that up-regulates the IL-12 receptor β 2-chain, T-bet and Blimp-1 [51], [52]. Moreover, IL-2-mediated activation of the

Fig 8. Splenic B6 or *P2rx7*^{-/-} CD4 cell co-transfer and protection against *Pc* infection. (A-D) Naïve CD4⁺ cells from B6 (CD45.1) and *P2rx7*^{-/-} (CD45.2) female mice were co-transferred into *Cd4*^{-/-} female mice that were then infected with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. Splenic CD4⁺ cells were analyzed at 30 days p.i. Non-infected mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant). (A) A schematic illustration of the experimental protocol is shown. (B) Dot plot shows CD45.1⁺CD4⁺ and CD45.1⁻CD4⁺ cell numbers per spleen at 30 days p.i. CD45.1⁺CD4⁺ and CD45.1⁻CD4⁺ cell percentages are shown in the column bar graph. (C) Contour plots show PD1 and CD39 expression in CD4⁺ cells. PD1^{hi}CD39^{lo}CD4⁺ and PD1^{lo}CD39^{hi}CD4⁺ cell percentages are shown in the column bar graphs. (D) Histograms show T-bet and Bcl6 expression in PD1^{hi}CD39^{lo}CD45.1⁺CD4⁺, PD1^{lo}CD39^{hi}CD45.1⁺CD4⁺, PD1^{hi}CD39^{lo}CD45.1⁻CD4⁺ and PD1^{lo}CD39^{hi}CD45.1⁻CD4⁺ cells. FMO controls are shown in the histograms. The MFIs of T-bet and Bcl6 expression are shown in the column bar graphs. (E-F) CD4⁺ cells from B6 and *P2rx7*^{-/-} female mice at 20 days p.i. were transferred into *Cd4*^{-/-} female mice that were infected with 1×10^5 *Pc*-iRBCs. *Cd4*^{-/-} mice transferred with naïve B6 cells were used as controls. The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 4-6$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) mice transferred with B6 cells at 0 and 20 days p.i. and (**) mice transferred with B6 and *P2rx7*^{-/-} cells at 20 days p.i. with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test. (E) A schematic illustration of the experimental protocol is shown. (F) Parasitemia curves are shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595.g008>

mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORc1) kinase axis up-regulates Blimp-1 expression and shifts differentiation away from Tfh cells, instead promoting that of Th1 cells [53]. Another evidence that IL-2 induced by P2X7 signaling influences the CD4 T cell response to *Pc* malaria was the lower increase of CD4 T cells expressing IL-2 receptor α - and β -chains in infected *P2rx7^{-/-}* mice compared with the B6 counterparts. Other cytokines can induce T-bet expression, such as IL-12, IL-27 and IFN α [38], [54], but the relationship of these signaling pathways with P2X7 receptor is unclear.

An alternative non-exclusive molecular mechanism by which the P2X7 receptor can change the Th1/Tfh balance relies on the high susceptibility of Tfh cells to ATP-induced cell death. Suggesting that this mechanism operates during *Pc* infection, P2X7 deficiency reduced the apoptotic cell death in germinal centers and PS exposure in Tfh cells. Furthermore, Tfh cells are particularly prone to die spontaneously through the P2X7 receptor. The relatively low CD39 expression may be insufficient to degrade eATP rapidly and thus prevent ATP-induced Tfh cell death, which can be accelerated by the extremely high levels of the P2X7 receptor in these cells. Similarly, in mouse Peyer's patches and human tonsils, the *P2rx7* gene is highly expressed in Tfh cells that are particularly responsive to eATP and undergo P2X7-mediated cell death [16]. In this study, as in ours, Tfh cell death was evaluated in B6 mice, which have an allelic mutation in the predicted death domain of P2X7 receptor that reduces eATP sensitivity [55]. Macrophages and lymphocytes from B6 mice respond to ATP stimulation and undergo P2X7-mediated cell death [16], [43], [56], although they are more resistant than cells from other mouse strains [55]. Therefore, the effects of eATP are expected to be greater on Tfh cells expressing the unmutated *P2rx7* gene. Regarding how splenic Tfh cells come into contact with eATP during *Pc* malaria, it is likely that the absence of compartmentalization between the white and red pulp observed at the acute infection makes available large amounts of locally released ATP from lysed iRBCs [57]. Lymphocytes stressed or dying as a result of the affinity maturation process, as well as lysed iRBCs in the marginal zone and in the vessels that irrigate the germinal centers, can be the sources of eATP during chronic *Pc* malaria.

The detailed analysis of the P2X7 receptor's role in the immune response to *Pc* infection allowed us to reveal the importance of this molecule in the fine-tuning between Th1 and Tfh cell populations. It is generally accepted that antibody affinity maturation and memory B cells develop properly in *Pc* malaria [58], [59]. Additionally, functional Tfh cells are necessary for an efficient antibody response and resolution of chronic *Pc* parasitemia [33]. Nevertheless, some control of Tfh cell differentiation through the P2X7 receptor appears to be required to generate the Th1 response to *Pc* infection, thus improving the disease outcome. Supporting this idea, mice transferred with B6 CD4 T cells at 20 days p.i. containing both Th1 and Tfh cells showed a better control of the first and second parasitemia peaks than those transferred with the *P2rx7^{-/-}* counterparts where there is a marked predominance of the Tfh phenotype. Of note, P2X7 deficiency led to better control of *P. yoelii* 17XNL malaria whose outcome seems to depend more on anti-parasite antibodies and less on IFN γ than in *Pc* malaria [32], [35]. A feasible explanation for this finding is that *Pc* merozoites, when released, rapidly infect nearby erythrocytes, but free *P. yoelii* 17XNL parasites are required to remain longer in the extracellular environment to find few reticulocytes, thereby making them easy targets for antibodies. In apparent contradiction to our results, the expansion of the Tfh cell population by inhibiting PD1 and lymphocyte activation gene (LAG)-3, or in mice deficient in IFN α receptor 1, improves the control of both *Pc* and *P. yoelii* 17XNL infections [32], [34]. However, the effect of Th1/Tfh imbalance cannot be appreciated under these conditions because IFN γ production is also increased. We propose here that elevated eATP in the spleen, which may occur during *Plasmodium* infection, might modify the CD4 T cell balance toward a more potent inflammatory response and hinder the antibody response. This concept is in line with a recent

study showing that the extremely intense inflammatory response during severe *Plasmodium berghei* ANKA infection drastically inhibits Tfh cell differentiation [60]. Thus, our study goes a step further in understanding malaria pathogenesis, suggesting that continuous ATP release and P2X7 signaling might not only promote the Th1 response but also delay antibody production during *Plasmodium* infection.

Our study provides mechanistic insights into malaria pathogenesis by demonstrating the importance of damage signals for the outcome of the disease. By promoting a balanced Th1/Tfh cell response, the immune system becomes more effective in protecting against *Pc* parasites whose control is based on both IFN γ and anti-parasite antibodies. It remains unclear whether the development of a robust Tfh cell response as a result of P2X7 deficiency is responsible for increasing the resistance to *P. yoelii* 17XNL infection. Human CD4 T cells express P2X7 receptor and secrete IL-2 following eATP stimulation [48], but it is still unknown whether P2X7 signaling influences the CD4 T cell response in malaria patients. Supporting the role of P2X7 signaling in controlling Tfh cell numbers in humans, tuberculosis patients carrying a single loss-of-function *P2rx7* gene polymorphism produce more IgG against mycobacteria than control groups [61]. This knowledge raises the possibility that the ATP-P2X7 axis can be manipulated with P2X7 agonists and antagonists to change the Th1/Tfh cell balance, aiming to ameliorate pathological conditions or to improve immunization protocols.

Materials and methods

Mice, parasites and infection

Six-to-eight-week-old C57BL/6 (B6), B6.SJL-*Ptprca*^a *Pepcb*^b/BoyJ (CD45.1^{+/+}), B6.129P2-*P2rx7*^{tm1Gab}/J (*P2rx7*^{-/-}), B6.Cg-*Fosn1*^{nu}/J (nude) and B6.129S2-*Cd4*^{tm1Mak}/J (*Cd4*^{-/-}) female and male mice (originally from The Jackson Laboratory) were bred under specific pathogen-free conditions at the Isogenic Mice Facility (ICB-USP, Brazil). The *P2rx7*^{-/-} mice were generated by Pfizer Inc. (USA); a single nucleotide polymorphism panel analysis throughout the genome suggested a B6 genetic background. The experiments were performed in female mice with the exception that females and males were compared. *Pc* and *P. yoelii* 17XNL parasites were maintained as described elsewhere [62]. Because the *Pc* schizogonic cycle depends on the host circadian rhythm, the mice were maintained under an inverted light/dark cycle for at least 15 days before infection to access the period adjacent to erythrocyte invasion [63]. Mice were infected intraperitoneally with 1×10^6 iRBCs.

Ethics statement

All experimental procedures were in accordance with national regulations of ethical guidelines for mouse experimentation and welfare of the Health National Council and Animal Experimentation Brazilian College (COBEA)—Brazil, the protocols being approved by the Health Animal Committee of USP, with permit numbers 050/2009 and 175/2011.

Parasitemias and clinical analysis

Parasitemias were monitored by microscopic examination of Giemsa-stained blood smears. Body weight variation was determined with respect to the day 0 weight with an analytical balance (Sartorius, USA). Axial temperature was assessed with a digital thermometer (Kent Scientific Co., USA). Hemoglobin serum concentration was evaluated with a hemoglobin kit (Doles Inc., Brazil).

Cell suspensions

Blood and spleen cells were washed and maintained in cold RPMI 1640 supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), 2-mercaptoethanol (50 µM), L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM) and 3% heat-inactivated fetal calf serum. All supplements were purchased from Life Technologies (USA). Leukocytes were obtained in 70% Percoll gradient (GE Health Care, USA). For the cell proliferation assay, spleen CD4 T cells were magnetically purified by negative selection. Non-CD4 T cells were labeled with biotinylated antibodies and streptavidin-coated magnetic particles and then were separated using an EasySep magnet (Stem Cell Technologies, Canada). For the calcium flux assay, spleen CD4 T cells were magnetically purified (LS columns) by positive selection using anti-CD4 microbeads with autoMACS (Miltenyi Biotec, Germany). For adoptive transfer, spleen CD4 T cells were magnetically purified (LS columns) by negative selection using anti-CD19, -IA^b and -CD8 microbeads with autoMACS (Miltenyi Biotec, Germany) and then were sorted using a FACS Aria device (BD Biosciences, USA). In some experiments, spleen CD4 T cells were magnetically purified by negative selection using an EasySep magnet and then were sorted using a FACS Aria device.

Cell phenotyping

Cells (1×10^6) were stained with FITC-, PE-, APC-, PerCP-, PECy7-, APC Cy7-, Pacific Blue-, or AmCyan-labeled monoclonal antibodies (mAbs) (BD Biosciences) to CD4 (H129.19 or GK1.5), CD19 (ID3), CD25 (PC61), CD39 (24DMS1), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CD122 (TM-β1), CD178 (ICOS) (7E.17G9), CD127 (A7R34), GL7 (GL7), PD1 (J43), CXCR5 (2G8) and P2X7 (1F11). For the detection of intracellular staining, PE-labeled mAb to Bcl-6 (K112-91, BD Biosciences), PerCP-labeled mAb to T-bet (eBio4B10; eBioscience, USA), PE-labeled mAb to Blimp-1 (6D3; BD Biosciences) and APC-labeled mAb to Foxp3 (FJK-16s; eBioscience) were used according to the manufacturer's instructions. PE-labeled rat IgG1 (BD Bioscience) and PerCP-labeled anti-CD45.1 mAb (A20; BD Bioscience) were used as isotype controls. Annexin V staining was performed in the appropriate binding buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂ [pH 7.4]). Cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCanto device with DIVA software (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo software v.7.7.2 (Tree Star Inc., USA).

Cell permeabilization assay

Blood and spleen cells (1×10^6) were stained with APC-labeled anti-CD4 mAb (BD Biosciences). In some experiments, stained cells were pre-warmed (37°C) in phosphate-buffered saline with 3% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and then incubated with 25–500 µM ATP (Amersham Bioscience, USA), lysed iRBC supernatant or medium alone for 15 min. The non-infected RBCs (nRBCs) and iRBCs (2×10^8) were lysed with 200 µl of lysis buffer (40 mM NH₄Cl, 4.2 mM Tris [pH 7.4]) for 5 min at 4°C. Spleen cells (1×10^6) were incubated with 200 µl of RBC supernatants diluted 1:5 in cold RPMI with 1% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). The fluorescent 2.5 µM EB dye (Sigma-Aldrich) was added, and the samples were immediately analyzed by flow cytometry.

ATP determination

ATP concentrations were determined using an ATP bioluminescence assay kit (Sigma-Aldrich). Serum (50 µl/well) was mixed 1:1 with the luciferase reagent. The bioluminescence was quantified in a temperature-controlled luminometer (Berthold, USA).

Cell proliferation assay

Purified CD4 T cells (3×10^7) were incubated for 20 min at 37°C with 5 μ M 5,6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, USA) in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich). CD4 T cells (5×10^5) were cultured with iRBCs (4×10^6) or medium alone, in the presence of spleen cells (5×10^5) from nude mice as a source of APCs, for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, stained with PE-Cy7-labeled anti-CD4 mAb and analyzed by flow cytometry. In the experiments using apyrase or BBG, spleen cells (3×10^7) were stained with CFSE as described above. Cells (1×10^6) were cultured with iRBCs (4×10^6) in the presence or absence of apyrase (20 U/ml) or BBG (35 μ M) for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, stained with PE-labeled mAb to CD4 and analyzed by flow cytometry.

Cytokine detection

For intracellular *ex vivo* detection, spleen cells (1×10^6) were cultured with GolgiStop reagent (containing monensin) according to the manufacturer's instructions for 6 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For intracellular *in vitro* detection, spleen cells (1×10^6) were cultured with iRBCs (4×10^6) or medium alone for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The GolgiStop reagent was added at the last 6 h of culture according to the manufacturer's instructions. After washing, cells were surface stained with APC- or Pacific Blue-labeled mAbs to CD4. Cells were then fixed with Cytofix/Cytoperm buffer, stained with PE-labeled mAb to IFN γ (XMG-1.2) and APC-labeled mAb to IL-10 (JESS-16E3) diluted in Perm/Wash buffer, and analyzed by flow cytometry. All reagents were purchased from BD Biosciences. The IL-2 cytokine secretion assay was performed according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). This assay uses a bi-functional mAb capable of binding CD45 and IL-2. Cells (2×10^6) were incubated with the bi-functional mAb for 45 min at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. The IL-2 bound to the surface of cells was detected with PE-labeled anti-IL-2 mAb by flow cytometry. For supernatant cytokine detection, spleen cells (1×10^6) were cultured with 3×10^6 iRBCs in the presence or absence of apyrase (20 U/ml), BBG (35 μ M) or medium alone for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cytokine concentrations were determined using the OptEIA IFN γ kit (BD Biosciences), OptEIA IL-10 kit (BD Biosciences) and mouse IL-21 ELISA (eBioscience).

Anti-parasite ELISA

The anti-*Pc* IgM, IgG1 and IgG2c serum levels were quantified by ELISA as described elsewhere [64]. Briefly, 96-well flat-bottom microtest plates (Costar, USA) were coated overnight at 4°C with 8 μ g/ml of a total *Pc* extract and saturated with 1% BSA for 3 h. After washing, 100 μ l of mouse serum samples (diluted from 1/10 to 1/1,280) were added and left overnight at 4°C. Antibody concentrations were determined using Ig standards. The assays were developed by adding goat anti-mouse Ig isotype peroxidase-conjugated antibodies (Southern Biotechnology Associates, USA) for 45 min, followed by the addition of 100 μ l of tetramethylbenzidine (Invitrogen, USA). Absorbance was measured at 650 nm with an Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, USA).

ELISPOT assay

Ig-producing cells were quantified by the ELISPOT assay as described elsewhere [65]. In brief, 96-well flat-bottom microtest plates (Costar) were coated overnight at 4°C with 10 μ g/ml of goat-anti-mouse total Ig and saturated with 1% gelatin (Merck, Germany) in PBS for 120 min. Spleen cells (1×10^6 to 5×10^2 cells/well) were cultured for 6 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The spots were developed by adding goat anti-mouse Ig isotype biotinylated antibodies overnight, followed by the addition of a phosphatase alkaline-avidin conjugate. All antibodies

and conjugates were purchased from Southern Biotechnologies Associates. 5-Bromo chloro 3-indolyl phosphate (BCIP; Sigma-Aldrich) diluted in 2-amino 2-methyl 1-propanol (AMP, Merck) was used as a substrate.

Calcium flux assay

CD4 T cells (1×10^7) were loaded with a mixture of 4 μ M Fura-3AM (Molecular Probes, USA) and 0.7 mg/ml of Probenecid (Sigma-Aldrich) at 37°C for 30 min. After washing, cells (1×10^5) were analyzed in a fluorescence microscope (Nikon Inverted Microscope, Japan) to determine the fluorescence intensity. Intracellular calcium was determined by calculating the corrected total cell fluorescence (CTCF). CTCF = integrated density—(area of selected cell $\times$ mean fluorescence of background readings).

TUNEL assay

Spleens were harvested and frozen in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, USA). In situ DNA fragmentation in 8- μ m-thick slices was performed using the DeadEnd Fluorometric TUNEL System according to the manufacturer's protocol (Promega, USA).

DNA fragmentation

APC-labeled anti-CD4 mAb stained cells (1×10^6) were fixed with 70% ethanol. After washing, cells were incubated in DNA extraction buffer (0.2 M Na_2HPO_4 and 0.1% Triton x-100, Sigma-Aldrich) at 24°C for 5 min, centrifuged and resuspended in a DNA staining solution (20 μ g/ml PI, Sigma-Aldrich). RNase (50 μ g) (Invitrogen) was then added to each sample, and the cells were incubated at 24°C for 30 min in the dark. PI incorporation was determined by flow cytometry.

Histology and immunofluorescence analysis

Spleens were fixed in buffered formol for 12 h and paraffin-embedded. Splenic tissue sections (5 mm) were hematoxylin-eosin stained using standard procedures. Spleens were harvested and immediately embedded in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Japan) and snap frozen. Slices measuring 8 μ m thick were fixed in acetone and blocked with 3% BSA plus Fc Block (1:100) (BD Bioscience) for 1 h at 24°C. Slides were then stained with anti-CD4-Alexa 700 (RM4-5) (eBioscience), CD19-APC (ID3), GL-7-Biotin (GL7) and Streptavidin-FITC (BD Biosciences) for 2 h at 24°C. After washing, slides were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes) and mounted with Vectashield mounting medium (Vector, USA). Sections were analyzed by confocal microscopy (Zeiss LSM 780, Germany).

Adoptive transfer

For CD4 T-cell phenotypic analysis, *Cd4*^{-/-} mice adoptively transferred i.v. with purified CD4 T cells (1.5×10^6) from naïve B6 or *P2rx7*^{-/-} mice were treated i.p. from day 7 p.i. with 3 every-other-day doses of chloroquine (10 mg/kg of body weight/day). Alternatively, *Cd4*^{-/-} mice co-transferred i.v. with purified B6 and *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells (1×10^6 /each population) from naïve mice were treated i.p. from day 7 p.i. with 3 consecutive daily doses of chloroquine (10 mg/kg of body weight/day). For parasitemia analysis, B6 or *P2rx7*^{-/-} CD4 T cells (1.5×10^6) at day 20 p.i. were transferred i.v. to *Cd4*^{-/-} mice.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney U test to compare two groups. For more than two groups, data were analyzed by Kruskal-Wallis test. Survival curves were

analyzed by the log-rank test using the Kaplan-Meier method. GraphPad Prism 6 software was used, in which differences between groups were considered significant when $p < 0.05$ (5%).

Supporting information

S1 Fig. Malaria parasite development and ATP serum levels in acutely infected B6 mice.

(A) The percentages of trophozoites, shizonts and ring stages were determined at 5 days p.i. with 1×10^6 iRBCs ($n = 3$). Arrows indicate the time at which blood samples were collected. (B) B6 and *P2rx7^{-/-}* female mice were analyzed at 4 and 5 days p.i. with 1×10^6 iRBCs. Naïve mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test. ATP concentrations were determined by bioluminescence in B6 mouse serum before and after iRBC rupture. The blood samples were collected at 9 a.m. ($6.5 \pm 0.5\%$ iRBC at day 4 p.i. and $10.5 \pm 1.5\%$ iRBCs at 5 days p.i.; $>95\%$ trophozoites and schizonts) and 2 p.m. ($12.0 \pm 1.2\%$ iRBC at day 4 p.i. and $25.0 \pm 3.7\%$ iRBCs at 5 days p.i.; $>95\%$ ring forms). (TIF)

S2 Fig. Effects of apyrase and BBG in splenic B6 CD4 T cell responses to iRBCs. (A-B) B6 mice were analyzed at 4 days p.i. with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant).

(A) CFSE-stained splenocytes were stimulated with iRBCs (1 splenocyte/ 4 iRBCs) in the presence or not of apyrase. CFSE^{lo}CD4⁺ cell percentages are shown in the column bar graph. IFN γ concentrations were determined by ELISA in the culture supernatants. (B) CFSE-stained splenocytes were stimulated with iRBCs (1 splenocyte/ 4 iRBCs) in the presence or not of BBG. CFSE^{lo}CD4⁺ cell percentages are shown in the column bar graph. IFN γ concentrations were determined by ELISA in the culture supernatants. (TIF)

S3 Fig. Phenotypic characterization of splenic CD4 T cells in acutely infected B6 and *P2rx7^{-/-}* mice. (A-F) B6 and *P2rx7^{-/-}* female mice were analyzed at 4, 7 and 20 days p.i. with 1×10^6 iRBCs. Naïve mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3-5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant).

(A) Contour plots show T-bet and Bcl6 expression in CD4⁺ cells. T-bet⁺Bcl6⁺ cell percentages in CD4⁺ cells are shown in the column bar graphs. Histograms show T-bet and Bcl6 expression in relation to FMO and isotype controls. (B) Histograms show T-bet and Bcl6 expression in relation to FMO and isotype controls. (C) Contour plots show PD1 and CXCR5 expression in CD4⁺ cells. (D) Foxp3⁺CD4⁺ cell numbers per spleen were determined by flow cytometry. (E) Contour plots show CD25 and CD122 expression in Foxp3⁺CD4⁺ cells. CD25⁺CD122⁺Foxp3⁺ cell percentages in CD4⁺ cells and CD25⁺CD122⁺Foxp3⁺CD4⁺ cell numbers per spleen are shown in the column bar graph. (F) Histograms show P2X7 and CD39 expression in CD4⁺, T-bet⁺Bcl6⁺CD4⁺ and T-bet⁺Bcl6⁺CD4⁺ cells. The MFIs of P2X7 and CD39 expression are shown in the column bar graphs. (TIF)

S4 Fig. CD4 TE, TEM and TCM cell numbers per spleen and phenotypic characterization of IFN γ - and IL-10-producing cells in chronically infected B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. (A-B) B6 and *P2rx7*^{-/-} female mice were analyzed at 20 and 30 days p.i. with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. Naïve mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) B6 and *P2rx7*^{-/-} groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant).

(A) The gating strategy used to define CD4⁺ cell subsets is shown. CD4 T_E (CD44^{hi}IL-7R α ⁻), T_{EM} (CD44^{hi}IL-7R α ⁺CD62L^{lo}) and T_{CM} (CD44^{hi}IL-7R α ⁺CD62L^{hi}) cell numbers per spleen were determined by flow cytometry.

(B) Contour plots (left) show IFN γ and IL-10 expression in CD4⁺ cells. The gate strategy to identify T_E, T_{EM} and T_{CM} cells is shown in the contour plot and histogram (upper right), according to CD44, CD127 and CD62L expression. IFN γ ⁺IL-10⁻CD4⁺ and IFN γ ⁻IL-10⁺CD4⁺ cells were analyzed using the same markers (middle and lower right).

(TIF)

S5 Fig. Characterization of splenic CD4 TE/EM and TCM cells from chronically infected B6 and *P2rx7*^{-/-} mice. (A-C) B6 and *P2rx7*^{-/-} female mice were analyzed at 20 and 30 days p.i. with 1×10^6 *Pc*-iRBCs. Naïve mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3-4$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) indicated groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant).

(A) Contour plots show naïve (CD44⁻CD62L^{hi}), CD4 T_{E/EM} (CD44⁺CD62L^{lo}) and T_{CM} (CD44⁺CD62L^{hi}) cells. Percentages of each CD4⁺ cell subset are shown. Histograms show T-bet expression in CD4⁺ cell subsets. FMO controls are shown in the Fig 5E. The MFIs of T-bet expression are shown in the scatter plots.

(B) Histograms show P2X7 expression in naïve (CD44⁻CD62L^{hi}), CD4 T_{E/EM} (CD44⁺CD62L^{lo}) and T_{CM} (CD44⁺CD62L^{hi}) cells. The MFIs of P2X7 expression are shown in the column bar graph.

(C) Contour plots show CD44 and CD62L expression in PD1^{hi}Bcl6⁺CD4⁺ and PD1⁻Bcl6⁻CD4⁺ cells.

(TIF)

S6 Fig. Splenic CD4 T cell populations in *Cd4*^{-/-} mice adoptively transferred with B6 or *P2rx7*^{-/-} CD4 cells and infected with *Pc* parasites. (A-B) Naïve CD4⁺ cells from B6 and *P2rx7*^{-/-} mice were transferred into *Cd4*^{-/-} mice that were infected with 1×10^6 iRBCs 7 days later. Splenic CD4⁺ cells were analyzed at 7 and 30 days p.i. Naïve mice were used as controls (day 0). The data were expressed as means $\pm$ SD ($n = 3-5$) of one representative experiment out of three. Significant differences were observed for the (*) B6 and *P2rx7*^{-/-} groups with $p < 0.05$, using the Mann Whitney U test (NS, not significant).

(A) CD4⁺ cell numbers per spleen were determined by flow cytometry.

(B) CD4 T_E (CD44⁺IL-7R α ⁻), T_{EM} (CD44⁺IL-7R α ⁺CD62L^{lo}) and T_{CM} (CD44⁺IL-7R α ⁺CD62L^{hi}) cell numbers per spleen were determined by flow cytometry.

(TIF)

Acknowledgments

We are grateful to Rogério Silva do Nascimento, Maria Áurea de Alvarenga and Mariana Franchi for their technical assistance, and the Central Facilities and Research Support (CEFAP) for cell sorting and confocal images. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa (UNICAMP, Brazil) kindly provided the *P. yoelii* 17XNL parasites.

Author Contributions

Conceptualization: Érika Machado de Salles, Henrique Borges da Silva, Eduardo Pinheiro Amaral, José Maria Alvarez, Robson Coutinho-Silva, Maria Regina D’Império-Lima.

Data curation: Érika Machado de Salles, Maria Regina D’Império-Lima.

Formal analysis: Érika Machado de Salles, Renan Siqueira, Isabela Cunha, David Nicholas Olivieri, Carlos Eduardo Tadokoro, Maria Regina D’Império-Lima.

Funding acquisition: Maria Regina D’Império-Lima.

Investigation: Érika Machado de Salles, Maria Nogueira de Menezes, Renan Siqueira, Eduardo Pinheiro Amaral, Sheyla Inés Castillo-Méndez, Isabela Cunha, Alexandra dos Anjos Cassado, Flávia Sarmento Vieira, Maria Regina D’Império-Lima.

Methodology: Érika Machado de Salles, Maria Nogueira de Menezes, Renan Siqueira, Henrique Borges da Silva, Eduardo Pinheiro Amaral, Sheyla Inés Castillo-Méndez, Robson Coutinho-Silva, Maria Regina D’Império-Lima.

Project administration: Maria Regina D’Império-Lima.

Resources: Maria Regina D’Império-Lima.

Software: Érika Machado de Salles, David Nicholas Olivieri, Carlos Eduardo Tadokoro.

Supervision: José Maria Alvarez, Robson Coutinho-Silva.

Validation: Érika Machado de Salles, Maria Regina D’Império-Lima.

Visualization: Érika Machado de Salles, Maria Nogueira de Menezes, Maria Regina D’Império-Lima.

Writing – original draft: Érika Machado de Salles, Maria Regina D’Império-Lima.

Writing – review & editing: Érika Machado de Salles, David Nicholas Olivieri, Carlos Eduardo Tadokoro, José Maria Alvarez, Maria Regina D’Império-Lima.

References

1. WHO (2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
2. Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K (2011) Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev* 240: 297–316. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00988.x> PMID: 21349101
3. Douradinha B, Doolan DL (2011) Harnessing immune responses against *Plasmodium* for rational vaccine design. *Trends Parasitol* 27: 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.01.002> PMID: 21531627
4. Stevenson MM, Riley EM (2004) Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 4: 169–180. <https://doi.org/10.1038/nri1311> PMID: 15039754
5. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K (2008) Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 9: 725–732. <https://doi.org/10.1038/ni.f.205> PMID: 18563083
6. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT (2014) Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 14: 744–757. <https://doi.org/10.1038/nri3742> PMID: 25324127
7. Ishii KJ, Akira S (2008) Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids. *Curr Opin Immunol* 20: 524–529. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.07.002> PMID: 18662775
8. Burnstock G, Kennedy C (2011) P2X receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 61: 333–372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00011-4> PMID: 21586364
9. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, et al. (2010) Pannexin 1 channels mediate ‘find-me’ signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467: 863–867. <https://doi.org/10.1038/nature09413> PMID: 20944749
10. Akkaya C, Shumilina E, Bobballa D, Brand VB, Mahmud H, et al. (2009) The *Plasmodium falciparum*-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. *Pflugers Arch* 457: 1035–1047. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0572-8> PMID: 18696103

11. Levano-Garcia J, Dluzewski AR, Markus RP, Garcia CR (2010) Purinergic signalling is involved in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* invasion to red blood cells. *Purinergic Signal* 6: 365–372. <https://doi.org/10.1007/s11302-010-9202-y> PMID: 21437007
12. Woehrle T, Yip L, Elkhail A, Sumi Y, Chen Y, et al. (2010) Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 116: 3475–3484. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-277707> PMID: 20660288
13. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272: 735–738. PMID: 8614837
14. Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, et al. (2005) Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell* 16: 3260–3272. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-11-1025> PMID: 15901833
15. Taylor SR, Gonzalez-Begne M, Dewhurst S, Chimini G, Higgins CF, et al. (2008) Sequential shrinkage and swelling underlie P2X7-stimulated lymphocyte phosphatidylserine exposure and death. *J Immunol* 180: 300–308. PMID: 18097031
16. Proietti M, Cornacchione V, Rezzonico Jost T, Romagnani A, Faliti CE, et al. (2014) ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism. *Immunity* 41: 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.010> PMID: 25464855
17. Schenk U, Frascoli M, Proietti M, Geffers R, Traggiai E, et al. (2011) ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci Signal* 4(162): ra12. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001270> PMID: 21364186
18. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, et al. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ T_{reg} cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110: 1225–1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527> PMID: 17449799
19. Pandolfi JB, Ferraro AA, Sananez I, Gancedo MC, Baz P, et al. (2016) ATP-Induced Inflammation Drives Tissue-Resident Th17 Cells in Metabolically Unhealthy Obesity. *J Immunol* 196: 3287–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502506> PMID: 26951799
20. Ohta A, Sitkovsky M (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414: 916–920. <https://doi.org/10.1038/414916a> PMID: 11780065
21. Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ (2012) The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol* 28: 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.006> PMID: 22100995
22. Stevenson MM, Tam MF, Belosevic M, van der Meide PH, Podoba JE (1990) Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun* 58: 3225–3232. PMID: 2119342
23. Su Z, Stevenson MM (2000) Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun* 68: 4399–4406. PMID: 10899836
24. Muxel SM, Freitas do Rosario AP, Zago CA, Castillo-Mendez SI, Sardinha LR, et al. (2011) The spleen CD4⁺ T cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties. *PLoS One* 6: e22434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022434> PMID: 21814579
25. Freitas do Rosario AP, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, Sardinha LR, Zago CA, et al. (2008) Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to *Plasmodium chabaudi* AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody. *J Immunol* 181: 8344–8355. PMID: 19050251
26. Stephens R, Langhorne J (2010) Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS Pathog* 6: e1001208. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001208> PMID: 21124875
27. da Silva HB, de Salles EM, Panatieri RH, Boscardin SB, Rodriguez-Malaga SM, et al. (2013) IFN-gamma-induced priming maintains long-term strain-transcending immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *J Immunol* 191: 5160–5169. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300462> PMID: 24133169
28. Freitas do Rosario AP, Lamb T, Spence P, Stephens R, Lang A, et al. (2012) IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4⁺ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *J Immunol* 188: 1178–1190. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102755> PMID: 22205023

29. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, et al. (2000) CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 192: 1553–1562. PMID: [11104798](#)
30. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, et al. (2000) Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192: 1545–1552. PMID: [11104797](#)
31. Hansen D, Obeng-Adjei N, Ly A, Ioannidis LJ, Crompton PD (2017) Emerging concepts in T follicular helper cell responses to malaria. *Int J Parasitol* 57: 105–110.
32. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, et al. (2011) Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol* 13: 188–95. <https://doi.org/10.1038/ni.2180> PMID: [22157630](#)
33. Pérez-Mazliah D, Ng DHL, Freitas do Rosário AP, McLaughlin S, Mastelic-Gavillet B, et al. (2015) Disruption of IL-21 signaling affects T cell-B cell interactions and abrogates protective humoral immunity to malaria. *PLoS Pathog* 11: e1004715. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004715> PMID: [25763578](#)
34. Sebina I, James KR, Soon MS, Fogg LG, Best SE, et al. (2016) IFNAR1-signalling obstructs ICOS-mediated humoral immunity during non-lethal blood-stage *Plasmodium* infection. *PLoS Pathog* 12: e1005999. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005999> PMID: [27812214](#)
35. Tsuji M, Miyahira Y, Nussenzweig RS, Aguet M, Reichel M, et al. (1995) Development of antimalaria immunity in mice lacking IFN-gamma receptor. *J Immunol* 154: 5338–44. PMID: [7537305](#)
36. Falanga PB D'Imperio Lima MR, Coutinho A, Pereira da Silva L (1987) Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by *Plasmodium chabaudi* and in immune-protected mice. *Eur J Immunol* 17: 599–603. <https://doi.org/10.1002/eji.1830170504> PMID: [3556194](#)
37. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, et al. (2009) Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325: 1006–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1175870> PMID: [19608860](#)
38. Lugo-Villarino G, Maldonado-Lopez R, Possemato R, Penaranda C, Glimcher LH (2003) T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7749–7754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332767100> PMID: [12802010](#)
39. Pepper M, Pagán AJ, Igyártó BZ, Taylor JJ, Jenkins MK (2011) Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity* 35: 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.009> PMID: [22018468](#)
40. Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ, Gong J, Darzynkiewicz Z. (1992) DNA strand breaks occurring during apoptosis: Their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Intl J Onc* 1: 639–648.
41. Correa G, Marques da Silva C, de Abreu Moreira-Souza AC, Vommaro RC, Coutinho-Silva R (2010) Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes Infect* 12: 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.004> PMID: [20298798](#)
42. Chaves MM, Marques-da-Silva C, Monteiro AP, Canetti C, Coutinho-Silva R (2014) Leukotriene B4 modulates P2X7 receptor-mediated *Leishmania amazonensis* elimination in murine macrophages. *J Immunol* 192: 4765–4773. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301058> PMID: [24729618](#)
43. Amaral EP, Ribeiro SC, Lanes VR, Almeida FM, de Andrade MR, et al. (2014) Pulmonary infection with hypervirulent *Mycobacteria* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathog* 10: e1004188. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004188> PMID: [24991816](#)
44. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, et al. (2008) Increased level of extracellular ATP at tumor sites: *in vivo* imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 3: e2599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002599> PMID: [18612415](#)
45. Wilhelm K, Ganesan J, Muller T, Durr C, Grimm M, et al. (2010) Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 16: 1434–1438. <https://doi.org/10.1038/nm.2242> PMID: [21102458](#)
46. Mota MM, Brown KN, Holder AA, Jarra W (1998) Acute *Plasmodium chabaudi chabaudi* malaria infection induces antibodies which bind to the surfaces of parasitized erythrocytes and promote their phagocytosis by macrophages in vitro. *Infect Immun* 66: 4080–4086. PMID: [9712751](#)
47. Lönnberg T, Svensson V, James KR, Fernandez-Ruiz D, Sebina I, et al. (2017) Single-cell RNA-seq and computational analysis using temporal mixture modelling resolves Th1/Tfh fate bifurcation in malaria. *Sci Immunol*. 2.
48. Yip L, Woehrl T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, et al. (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 23: 1685–1693. <https://doi.org/10.1096/fj.08-126458> PMID: [19211924](#)

49. Feske S, Skolnik EY, Prakriya M (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat Rev Immunol* 12: 532–547. <https://doi.org/10.1038/nri3233> PMID: 22699833
50. Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA (2003) Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 170: 2962–2970. PMID: 12626548
51. Gong D, Malek TR (2007) Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J Immunol* 178: 242–252. PMID: 17182561
52. Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ (2011) Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol* 12: 551–559. <https://doi.org/10.1038/ni.2030> PMID: 21516110
53. Ray JP, Staron MM, Shyer JA, Ho PC, Marshall HD, et al. (2015) The Interleukin-2-mTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling, Differentiation, and Metabolism of T Helper 1 and Follicular B Helper T Cells. *Immunity* 43: 690–702. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.017> PMID: 26410627
54. Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA (2003) IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 23: 513–522. <https://doi.org/10.1089/10799900360708632> PMID: 14565860
55. Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F, et al. (2002) A natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* 169: 4108–4112. PMID: 12370338
56. de Campos NE, Marques-da-Silva C, Corrêa G, Castelo-Branco MT, de Souza HS, et al. (2012) Characterizing the presence and sensitivity of the P2X7 receptor in different compartments of the gut. *J Innate Immun* 4: 529–541. <https://doi.org/10.1159/000336628> PMID: 22508425
57. Borges da Silva H, Fonseca R, Cassado AA, Salles EM, Menezes MN, et al. (2015) In vivo approaches reveal a key role for DCs in CD4+ T cell activation and parasite clearance during the acute phase of experimental blood-stage malaria. *PLoS Pathog* 11: e1004598. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004598> PMID: 25658925
58. Achtman AH, Stephens R, Cadman ET, Harrison V, Langhorne J (2007) Malaria-specific antibody responses and parasite persistence after infection of mice with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Parasite Immunol* 29: 435–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00960.x> PMID: 17727567
59. Ndungu FM, Cadman ET, Coulcher J, Nduati E, Couper E, et al. (2009) Functional memory B cells and long-lived plasma cells are generated after a single *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *PLoS Pathog* 5: e1000690. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000690> PMID: 20011127
60. Ryg-Cornejo V, Ioannidis LJ, Ly A, Chiu CY, Tellier J, et al. (2016) Severe malaria infections impair germinal center responses by inhibiting T follicular helper cell differentiation. *Cell Rep* 14: 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.006> PMID: 26725120
61. Wu J, Lu L, Zhang L, Ding Y, Wu F, et al. (2015) Single nucleotide polymorphisms in P2X7 gene are associated with serum immunoglobulin G responses to *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients. *Dis Markers* 2015: 671272. <https://doi.org/10.1155/2015/671272> PMID: 26798189
62. Podoba JE, Stevenson MM (1991) CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun* 59: 51–58. PMID: 1898902
63. Cavinato RA, Bastos KR, Sardinha LR, Elias RM, Alvarez JM, et al. (2001) Susceptibility of the different developmental stages of the asexual (schizogonic) erythrocyte cycle of *Plasmodium chabaudi chabaudi* to hyperimmune serum, immunoglobulin (Ig)G1, IgG2a and F(ab')2 fragments. *Parasite Immunol* 23: 587–597. PMID: 11703810
64. Elias RM, Sardinha LR, Bastos KR, Zago CA, da Silva AP, et al. (2005) Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. *J Immunol* 174: 790–799. PMID: 15634900
65. Lima MR, Bandeira A, Falanga P, Freitas AA, Kipnis TL, et al. (1991) Clonal analysis of B lymphocyte responses to *Plasmodium chabaudi* infection of normal and immunoprotected mice. *Int Immunol* 3: 1207–1216. PMID: 1777417